



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

**POSGRADO EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

**Detección de virus del papiloma humano 16, 18 y  
33 mediante amplificación isotérmica de sondas  
padlock tipo-específicas para el oncogén E6**

Tesis que presenta  
**Cindy Citlalli Jacqueline Gómez Correa**

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

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

San Luis Potosí, S.L.P., octubre de 2017



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "*Detección de virus del papiloma humano 16, 18 y 33 mediante amplificación isotérmica de sondas padlock tipo específicas para el oncogén E6*" presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Cindy Citlalli Jacqueline Gómez Correa** y aprobada el seis de octubre del dos mil diecisiete por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

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

**Dra. Lina Raquel Riego Ruiz**  
Miembro del Comité Tutorial

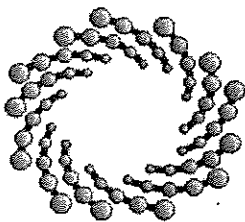
**Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga**  
Miembro del Comité Tutorial



## **Créditos institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo de tesis la autora recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (559623) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



**IPICYT**

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

## Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 172 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 6 días del mes de octubre del año 2017, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga</b>	<b>Presidente</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Secretaria</b>	<b>IPICYT</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:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Cindy Citlalli Jacqueline Gómez Correa**

sobre la Tesis intitulada:

*Detección de virus del papiloma humano 16, 18 y 33 mediante amplificación isotérmica de sondas padlock tipo específicas para el oncogén E6*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**

El Jurado, después de deliberar, determinó

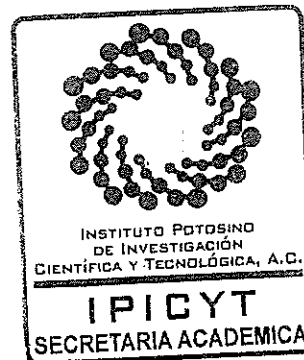
**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 13:13 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 6 días del mes de octubre de 2017.

  
**Dr. Horacio Flores Zúñiga**  
Secretario Académico

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



## Dedicatorias

Este trabajo se lo dedico a la persona que un día me despertó de madrugada, para decirme hacia donde me tenía que dirigir, clamé, clamé y clamé y después de tantos días, “Universidades CONACYT” fue lo que escuché, breve y claro, yo no sabía lo que me esperaba... estuvo conmigo acompañándome cuando estudiaba de madrugada, al lado mío cuando despertaba cada mañana, cuando comía sola a la mesa, en cada momento de frustración, desánimo y muchas más de gozo, paz y aún otras en las que jugaba conmigo para hacerme reír. Este trabajo se lo dedico a la persona del Espíritu Santo, gracias por estar conmigo en todo tiempo, en todo lugar.

A mi papá el Sr. Urbano Gómez Guerrero que me enseñó que los sueños se pueden hacer realidad. A mi mamá la Sra. Elena Correa Sárate que siempre me dijo que tenía la capacidad de hacer cualquier cosa. A mis hermanos Erik Gómez Correa y Elena Gómez Correa que en algunas ocasiones tuvieron que dejar sus anhelos a un lado para ayudarme a cumplir los míos. A mi abuelita Sra. Antonia Zárate Vázquez por dejar a un lado el ritmo de su vida y hasta cambiar de ciudad para acompañarme.

Gracias a Dios y a su Hijo Jesús por esta vida tan maravillosa.

## Agradecimientos

Agradezco a Dios por la vida del Dr. Rubén López Revilla que como se lo dije en una ocasión lo considero como mi padre en la ciencia, fue quien construyó los cimientos en mí para este bello arte que es la investigación, siempre me estuvo guiando, instruyendo, fue muy paciente y comprensivo, dejaba a un lado su trabajo por dedicar tiempo al mío, en mí ha sembrado una buena semilla que dará fruto al 100 por 1.

Agradezco a Dios por la vida de la bióloga Mireya Sánchez Garza que siempre está dispuesta a ayudar, a colaborar con todos, que en varias ocasiones se dio tiempo para platicar sobre inquietudes de mi futuro profesional, y cuando fue necesario me hizo poner los pies en la tierra. Gracias por su apoyo técnico y por ser tan generosa.

Agradezco a Dios por la vida del Dr. Raúl de la Rosa Martínez quién me enseñó que es una micropipeta, a trabajar de forma correcta, ordenada, limpia y que siempre se pueden hacer mejor las cosas, además junto con mi familia fue quien me empujó a sumergirme en este mundo. Gracias por invertir en mí y contagiarme de tu excelencia.

Agradezco a Dios por la vida de mis asesores la Dra. Lina Riego Ruiz y el Dr. Gerardo Argüello Astorga por decidir en algún momento de sus vidas tomar este camino, tener el privilegio de conocerlos y de tomarse el tiempo para leer este escrito.

Agradezco a Dios por la vida de Alan Martínez que fue quien abrió camino para este trabajo, gracias por sus instrucciones, sus consejos y sus notas. A la Dra. Lucía Orellana por ser mi brazo derecho y tener siempre un espíritu enseñable y un corazón dispuesto. A Gloria López Niño por su disposición y siempre buen ánimo en el apoyo con el material de trabajo.

Agradezco a Dios por la vida de Mariana y Lucía quienes me enseñaron que enseñando también se puede aprender, gracias por estar siempre dispuestas y prestas a ayudar.

Y finalmente, a Claudia, Julián, Mariel, Tomás e Isa por acompañarme en momentos difíciles y sobre todo de mucha alegría. También a quienes serán inolvidables en mi vida: Paty, Paola, Clarita, Ricardo, Guillermo, Marco, Jocelin, Víctor, Fanny, Juan Carlos, Gabriel, Julio, Adriana, Cinthya, Rogelio, Erik, Aarón, Oscar, Esaú, Miriam, Liz, Cecy, Rodrigo, a la Dra. Angélica Montoya, al Dr. Luis Salazar, a mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria, gracias a Dios por cada uno de ustedes.

# Contenido

<b>Créditos institucionales</b>	<b>iii</b>
<b>Copia del acta del examen</b>	<b>iv</b>
<b>Dedicatorias</b>	<b>v</b>
<b>Agradecimientos</b>	<b>vi</b>
<b>Lista de tablas</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de figuras</b>	<b>x</b>
<b>Resumen</b>	<b>xii</b>
<b>Abstract</b>	<b>xiii</b>
<b>Introducción</b>	<b>1</b>
Virus del papiloma humano	1
VPH y cáncer cervicouterino	1
VPH en San Luis Potosí	3
Sondas padlock	4
Justificación	5
Etapas del trabajo	5
Resultados y conclusiones principales	6
<b>Material y métodos</b>	<b>7</b>
Plásmidos con genomas completos de diversos tipos de VPH	7
Transformación de <i>E. coli</i> TOP10	7
<i>Obtención de clones transformantes</i>	7
<i>Criopreservación de las clones transformantes</i>	7
Amplificación de segmentos de los genes E6 y L1	9
Caracterización de los plásmidos	9
<i>Preparaciones de ADN plasmídico</i>	9
<i>Análisis de restricción</i>	10
<i>Amplicones de los ORF L1 y E6</i>	10
<i>Secuenciación de los insertos de pHPV16, pHPV18 y pHPV33</i>	10
Sondas padlock	11
<i>Características de las sondas</i>	11
<i>Análisis bioinformático de las sondas</i>	11
<i>Manejo de las sondas</i>	12
Ensayos SP-RCA	12
<i>Ensayo preliminar de SP-VPH16</i>	12
<i>Ensayos con TempliPhi 100 y Pol <math>\Phi</math>29</i>	12
<i>Ensayo de un raspado cervical con VPH 16</i>	13
<b>Resultados</b>	<b>14</b>
Clonas de <i>E. coli</i> TOP 10 transformadas con plásmidos que portan genomas completos de VPH	14
Obtención y caracterización de pHPV16, pHPV18 y pHPV33	14
<i>Preparaciones de los plásmidos de interés</i>	14
<i>Análisis de restricción de los plásmidos de interés</i>	17
<i>Amplicones de los ORF L1 y E6 generados a partir de los plásmidos</i>	17

<i>Secuencias de los ORF E6/E7 de pHPV16, pHPV18 y pHPV33</i>	17
Sondas padlock para los ORF E6 de VPH 16, 18, 33 y 45	21
<i>Diseño</i>	21
<i>Validación in silico de las sondas</i>	28
Ensayo preliminar de la sonda SP-VPH16	36
Ensayos SP-RCA con TempliPhi 100 o Pol $\Phi$ 29 y variaciones en el contenido de sonda y tiempo de incubación	38
SP-RCA de un raspado cervical con VPH 16	42
<b>Discusión</b>	<b>44</b>
<b>Referencias</b>	<b>46</b>



## Lista de tablas

Tabla 1. Plásmidos con genomas completos de 14 tipos de VPH	8
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados y tamaño de los amplicones esperados	15
Tabla 3. Clonas transformantes de <i>E. coli</i> TOP 10 obtenidas	15
Tabla 4. Preparaciones de plásmidos obtenidos de las clonas transformantes	16
Tabla 5. Fragmentos de restricción de pHPV16, pHPV18 y pHPV33	18
Tabla 6. Amplificación de los ORF E6/E7 y L1 mediante PCR de colonia de las clonas transformantes	19
Tabla 7. Longitud (número de nucleótidos) de los elementos en las sondas padlock	29
Tabla 8. Secuencias de las sondas padlock	34
Tabla 9. Hibridación de las sondas a los ORF E6 respectivos (hits con Blastn)	34
Tabla 10. Alineación de las secuencias anclaje-extensión yuxtapuestas de SP-VPH16 a los ORF E6 de variantes de los tipos VPH 16, 18, 33 y 45	35
Tabla 11. Ensayo SP-RCA preliminar de SP-VPH16 con TempliPhi 100	37
Tabla 12. Ensayos SP-RCA de SP-VPH16, SP-VPH18 y SP-VPH33 con TempliPhi 100 y Pol $\Phi$ 29	43

## Lista de figuras

Fig. 1. Organización del genoma de los virus del papiloma humano	2
Fig. 2. Preparaciones de plásmidos con genomas completos de VPH 16, 18 y 33	16
Fig. 3. Fragmentos de restricción de pHPV16, pHPV18 y pHPV33	18
Fig. 4. Amplicones del ORF L1 (~450 pb) iniciados con la pareja MY09/11 a partir de ADN de células SiHa, HeLa o plásmidos con genomas completos de diversos tipos de VPH	19
Fig. 5. Amplicones de la región E6/E7 (~630 pb) generados con los iniciadores consenso (GP-E6-3F, GP-E7-5B y GP-E7-6B) de Sotlar et al. (2004) a partir de plásmidos con genomas de diversos tipos de VPH	20
Fig. 6. Amplicones de la región E6/E7 generados por PCR multiplex anidada a partir de plásmidos con el genoma completo de diversos tipos de VPH	20
Fig. 7. Oligonucleótidos empleados para la detección de VPH basada en el tamaño de los productos de amplificación de los ORF L1 y E6	22
Fig. 8. Secuencia de la región E6/E7 de pHPV16 (980 pb)	23
Fig. 9. Alineación de la secuencia del ORF E6 de VPH 16 de referencia con la secuencia de pHPV16 (462 pb)	24
Fig. 10. Diferencias en las secuencias de aminoácidos de las oncoproteínas E6 codificadas en el genoma de referencia de VPH 16 (474 pb) y en pHPV16 (459 pb)	25
Fig. 11. Secuencia del ORF E6 de pHPV18 (477 pb)	26
Fig. 12. Alineación de la secuencia de la región E6 de VPH 18 de referencia con la de pHPV18 (477 pb)	26
Fig. 13. Secuencia de la región E6 de pHPV33 (514 pb)	27
Fig. 14. Alineación de la secuencia de la región E6 de VPH 33 con la de pHPV33 (514 pb)	27
Fig. 15. Alineación de los ORF E6 de VPH 16, 18, 33 y 45	29
Fig. 16. Alineación de las secuencias blanco de los ORF E6 de pHPV16, pHPV18 y pHPV33 con las secuencias de hibridación de las sondas respectivas	31
Fig. 17. Homodímeros de las sondas padlock para VPH 16, 18, 33 y 45	31
Fig. 18. Heterodímeros de las sondas padlock para VPH 16, 18 y 33	32
Fig. 19. Estructuras secundarias de las sondas padlock a 65 °C	33
Fig. 20. Las mezclas de RCA para SP-VPH16 generan el monómero esperado (96 pb) a partir del amplicón E6 457 generado por PCR-MA o a partir de pHPV16 intacto o linearizado	37
Fig. 21. Ensayos SP-RCA con TempliPhi 100 o Pol $\Phi$ 29	39
Fig. 22. Las mezclas de RCA para SP-VPH16 generan el monómero esperado (96 pb) con pHPV16 más intenso con $10^{11}$ moléculas de sonda	39

Fig. 23. La mezcla de RCA para SP-VPH18 genera el monómero esperado (114 pb) a partir de pHPV18	40
Fig. 24. Las mezclas de RCA para SP-VPH33 generan el monómero esperado (132 pb) a partir de pHVP33	40
Fig. 25. Los monómeros de cada sonda tienen las migraciones esperadas en ensayos SP-RCA con Pol $\Phi$ 29	41
Fig. 26. El ensayo SP-RCA con ADN del raspado cervical 60 (infección única por VPH 16) genera el monómero esperado (96 pb)	43

# Resumen

## **Detección de virus del papiloma humano 16, 18 y 33 mediante amplificación isotérmica de sondas padlock tipo-específicas para el oncogén E6**

La infección persistente por virus del papiloma humano (VPH) de alto riesgo causa el cáncer cervicouterino (CaCu). Para identificar los tipos de VPH generalmente se emplea la reacción en cadena de la polimerasa. Los ensayos con sondas padlock (SP) --basados en amplificación por el mecanismo de círculo rodante (RCA)-- no requieren termociclador y podrían emplearse para tipificar VPH en el sitio de atención. Las SP son oligodesoxinucleótidos lineales con tres elementos: 1) brazo de anclaje en el extremo 5', 2) brazo de extensión en el extremo 3', y 3) elemento espaciador interno con una secuencia para un sitio de restricción generado en la sonda amplificada, de cadena doble. Cuando los brazos de anclaje y extensión hibridan con la secuencia blanco sus bordes yuxtapuestos pueden ser ligados enzimáticamente y las SP circularizadas de esta manera pueden ser amplificadas isotérmicamente como concatémeros lineales formados por monómeros de cadena doble en tándem. Nos propusimos desarrollar ensayos SP-RCA uniplex para detectar el oncogén E6 de los tipos de VPH de alto riesgo 16, 18 y 33, altamente prevalentes en CaCu, con sondas padlock tipo-específicas que pudieran combinarse en ensayos multiplex. Diseñamos tres sondas de diferente longitud con un sitio *Bam* HI en el elemento espaciador: SP-VPH16, de 96 nucleótidos (nt); SP-VPH18, de 114 nt; SP-VPH33, de 132 nt. Los ensayos SP-RCA se llevaron a cabo en seis pasos: 1) desnaturalización del ADN blanco a 95 °C, 2) hibridación de la sonda a la secuencia blanco a 65 °C, 3) ligación de la sonda hibridada a 25 °C, 4) amplificación de la sonda circularizada iniciada por hexanucleótidos aleatorios a 30 °C, 5) restricción de los concatémeros de cadena doble con *Bam* HI a 37 °C, y 6) análisis electroforético de los monómeros. El análisis *in silico* de homodímeros, heterodímeros y estructuras secundarias a 65 °C indicó que las sondas podrían detectar 33 variantes de VPH 16, 18 y 33. Obtuvimos monómeros de los tamaños esperados a partir de ensayos SP-RCA uniplex con plásmidos que portan genomas completos de los tres tipos virales y ADN de un raspado cervical con VPH 16. Concluimos que los ensayos SP-RCA uniplex podrían usarse para diagnosticar infecciones tipo-específicas por VPH en el sitio de atención.

**Palabras clave:** Cáncer cervicouterino; Virus del papiloma humano; Sondas padlock; Amplificación isotérmica; Amplificación por círculo rodante.

# Abstract

## Detection of human papillomaviruses 16, 18 and 33 by isothermal amplification of type-specific E6 oncogene padlock probes

Persistent infection with high-risk human papillomavirus (HPV) causes cervicouterine cancer (CC). The polymerase chain reaction is generally used to identify HPV types. Assays with padlock probes (PPs) --based on isothermal rolling circle amplification (RCA)-- do not require a thermocycler and might be used to typify HPV at the point of care. PPs are linear oligonucleotides with three elements: 1) anchorage arm at the 5'-end, 2) extension arm at the 3'-end, and 3) internal spacer element which includes a sequence for a restriction site generated in the double-stranded amplified probe. When the anchorage and extension arms hybridize to the target sequence their juxtaposed borders may be enzymatically linked, and the circularized PPs can be isothermally amplified as linear concatemers formed by double-stranded monomers arranged in tandem. Our aim was to develop uniplex PP-RCA assays to detect E6 oncogenes of the high-risk HPV types 16, 18 and 33, highly prevalent in CC, using type-specific probes that might be combined in multiplex assays. Three probes of different length that include a *Bam* HI restriction site in the spacer element were designed: PP-VPH16 of 96 nucleotides (nt); PP-VPH18 of 114 nt; PP-VPH33 of 132 nt. PP-RCA assays were carried out in six steps: 1) target DNA denaturation at 95 °C, 2) hybridization of the probes to the target sequence at 65 °C, 3) ligation of the hybridized probe at 25 °C, 4) amplification of the circularized probe primed by random hexanucleotides at 30 °C, 5) restriction of the double-stranded concatemers with *Bam* HI at 37 °C, and 6) electrophoretic analysis of the monomers. *In silico* analysis of homodimers, heterodimers and secondary structures formed at 65 °C indicated that the probes would detect 33 variants from HPV 16, 18 and 33. The expected monomers were obtained in uniplex PP-RCA assays with plasmids carrying complete genomes of the three viral types and with DNA from a cervical scrape with HPV 16. We conclude that the uniplex assays developed here might be used to diagnose HPV type-specific infections at the point of care.

**Keywords:** Cervical cancer; Human papillomavirus detection; Padlock probes; Isothermal amplification; Rolling circle amplification.

# Introducción

## Virus del papiloma humano

Los virus del papiloma humano (VPH) infectan células epiteliales de la piel y las mucosas y al replicarse en ellas inducen proliferación que puede llegar a provocar tumores benignos (papilomas, condilomas o verrugas) o malignos, entre los cuales destaca el cáncer cervicouterino (CaCu) (Munoz et al. 2006).

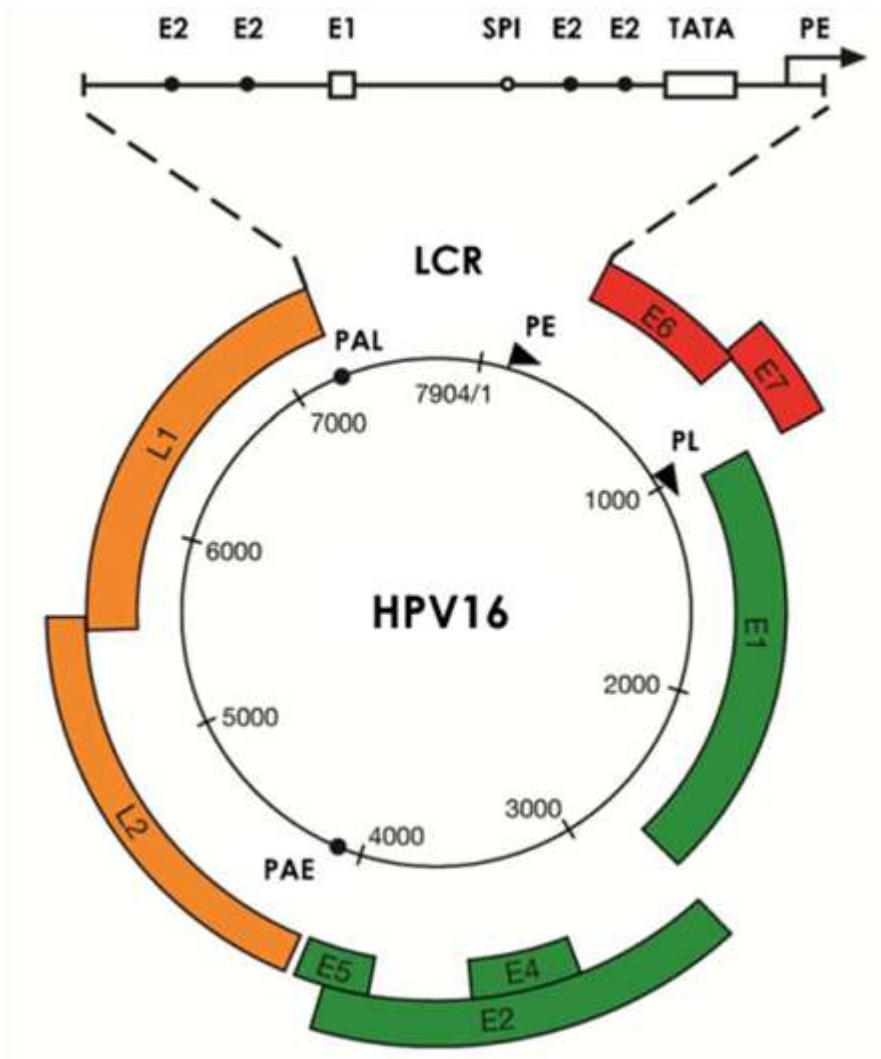
La familia de los VPH incluye más de 150 genotipos (“tipos”) que constituyen numerosos géneros y especies. Los tipos de VPH han sido agrupados en un árbol filogenético en el que cada tipo difiere  $\geq 10\%$  en las secuencias del marco de lectura abierto (ORF, *open reading frame*) del gen L1. Las secuencias de los subtipos difieren entre el 2% y el 10% y las de las variantes  $\leq 2\%$  (de Villiers et al. 2004).

Cuarenta tipos de VPH mucosotrópicos, también llamados anogenitales, infectan el tracto anogenital y la región orofaríngea y son transmitidos por contacto sexual (de Villiers et al. 2004).

Los viriones de VPH son icosaédricos, sin envoltura lipídica, con cápsides formadas por dos proteínas estructurales. Su genoma es ADN circular de cadena doble de alrededor de 8,000 pares de bases (pb), con seis genes tempranos (E, *early*) llamados E6, E7, E1, E2, E4, E5 que codifican proteínas no estructurales, y dos genes tardíos (L, *late*) llamados L1 y L2 que codifican las proteínas estructurales de los viriones (Fig. 1). Los viriones de VPH inician la infección en las células del estrato basal de los epitelios y mantienen su replicación y transcripción a un nivel bajo que va aumentando conforme se diferencian las células infectadas (Doorbar et al. 2012).

## VPH y cáncer cervicouterino

Los tipos de VPH anogenitales se clasifican como de alto riesgo (AR) y de bajo riesgo (BR). Los VPH-AR tienen mayor capacidad carcinogénica porque las



**Fig. 1. Organización del genoma de los virus del papiloma humano**

El genoma de los VPH comprende la región larga de control (LCR) y ocho genes necesarios para la replicación. La LCR tiene sitios de unión a factores de transcripción (SPI) así como para las proteínas virales E1 y E2. PE es el promotor temprano y PL el promotor tardío. PAE y PAL son las posiciones temprana y tardía de los sitios de poliadenilación en el genoma, respectivamente (Tomado de Doorbar, 2004).

proteínas codificadas por los 'oncogenes' virales E6 y E7 se unen respectivamente a las proteínas supresoras de tumores p53 y retinoblastoma (Rb) y las inactivan, por lo cual inducen la división celular y previenen la apoptosis. Se cree que los VPH-BR solamente provocan tumores benignos en las mucosas porque sus oncoproteínas tienen menor afinidad por p53 y Rb (Doorbar et al. 2012).

Hay una estrecha relación entre los VPH y el CaCu. Los VPH anogenitales son la causa más común de infecciones de transmisión sexual y la persistencia de la infección por VPH-AR es un factor necesario para desarrollar CaCu (Schellekens et al. 2004; Schmeink et al. 2013; van Ham et al. 2005; van Hamont et al. 2006; Walboomers et al. 1999; zur Hausen 1996).

El CaCu es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres del mundo y de México. Cada año se estiman alrededor de 530,000 casos nuevos y 270,000 muertes por CaCu en el mundo y más del 70% de las lesiones neoplásicas del cérvix, cancerosas o precancerosas, son ocasionadas por VPH 16 o 18 (OMS 2016). Estos dos tipos virales también se encuentran en cánceres de vagina, vulva y pene y en cánceres orofaríngeos (paladar blando, base de la lengua y amígdalas), aunque los últimos se asocian principalmente a VPH 16 (INC 2015).

## **VPH en San Luis Potosí**

Nuestro grupo ha realizado tres estudios que demostraron diferencias en la prevalencia de los tipos de VPH en las infecciones del cérvix y el CaCu en San Luis Potosí.

Primero determinó la prevalencia de siete tipos de VPH-AR en 442 raspados cervicales de mujeres con neoplasia intraepitelial cervical (NIC) de grados 1, 2 y 3 y carcinoma invasor en la ciudad de San Luis Potosí y tres ciudades de Guanajuato mediante PCR anidada/RFLP de la región E6 de VPH-AR (Lopez-Revilla et al. 2008). Los tipos virales más prevalentes fueron VPH 16 (53.4%), VPH 31 (15.6%) y VPH 18 (8.9%), en concordancia con estudios multicéntricos globales (Bruni et al. 2010; Clifford et al. 2003; Smith et al. 2007).

El siguiente estudio, en raspados cervicales de 700 mujeres de todo el estado diagnosticados mediante PCR multiplex anidada, demostró que los tipos de VPH-



AR más prevalentes fueron VPH 33 (33.1%), VPH 16 (16.6%) VPH 18 y VPH 51 (6.7% cada uno) (DelaRosa-Martinez et al. 2016).

Finalmente, entre 103 bloques de parafina de CaCu invasor del Hospital Central Ignacio Morones Prieto --ubicado en la capital del estado-- que concentra casos del propio estado y los estados vecinos, 83 casos fueron VPH-positivos y en ellos se identificaron 12 tipos de alto riesgo (VPH 16, 45, 51, 52, 31, 59, 18, 33, 35, 56, 58 y 73). El tipo más prevalente fue VPH 16 (34.1%), seguido por VPH 45 (15.9%) (Magaña-León 2017).

En resumen, los tipos de VPH de alto riesgo más prevalentes en las infecciones y cánceres invasores del cérvix en San Luis Potosí y Guanajuato son VPH 16, 18, 33 y 45, por lo cual dirigimos este trabajo.

## **Sondas padlock**

Las sondas *padlock* (SP) son oligodesoxinucleótidos lineales con secuencias específicas que al hibridar con las secuencias complementarias en el ADN blanco yuxtaponen sus extremos y pueden ser circularizadas por ligación enzimática. Los círculos de cadena sencilla son luego amplificados exponencialmente en condiciones isotérmicas por el mecanismo de círculo rodante (RCA, *rolling circle amplification*) (Nilsson et al. 1994). Los ensayos SP-RCA son cada vez más empleados y están desplazando a la PCR convencional porque mantienen la especificidad pero son más sensibles, sencillos y baratos y no requieren termociclador.

Las sondas padlock constan de tres partes: dos brazos de unos 20 nucleótidos en los extremos 5' y 3' respectivamente, y un elemento espaciador de longitud variable entre los brazos con una secuencia que al replicarse como ADN de cadena doble genera un sitio de corte único para una endonucleasa. La secuencia lineal continua de los brazos de la sonda es complementaria a la secuencia blanco y la yuxtaposición de los extremos de los brazos hibridados a la secuencia blanco permite la ligación enzimática que resulta en la circularización de la sonda hibridada (Nilsson et al. 1994).

La sonda circularizada es amplificada exponencialmente en condiciones isotérmicas para generar múltiples concatémeros constituidos por monómeros de ADN lineal de cadena doble repetidos en tándem. La restricción de los concatémeros con una endonucleasa apropiada genera monómeros de un tamaño que depende de la longitud de la sonda, determinada principalmente por el elemento espaciador (Baner et al. 1998).

## **Justificación**

El diagnóstico de infecciones del cérvix por VPH basada en la detección del ADN viral es más eficiente que el Papanicolaou para identificar mujeres con lesiones neoplásicas precursoras y cáncer (Mayrand et al. 2007), y las infecciones por VPH pueden ocurrir incluso en casos con citología normal (Bruni et al. 2010).

Por otra parte, la mayoría de los métodos para el diagnóstico de VPH se concentran en la detección del ADN viral, raramente en la genotipificación y todavía menos en la identificación de las variantes intratípicas.

El diagnóstico mediante ensayos SP-RCA podría lograr que la identificación de los principales tipos de VPH-AR sea más sencilla, sensible y barata. Por eso nos propusimos desarrollar ensayos SP-RCA para el ORF E6 de los cuatro tipos de VPH-AR más prevalentes en infecciones y carcinomas del cérvix en San Luis Potosí: VPH 16, 18, 33 y 45.

## **Etapas del trabajo**

El trabajo se llevó a cabo en cinco etapas:

1. Selección de secuencias blanco de los ORF E6/E7 de VPH 16, 18, 33 y 45.
2. Diseño de SP tipo-específicas
  - a. Secuencia lineal de los dos brazos de cada sonda yuxtapuestos a la secuencia blanco (ORF E6/E7).
  - b. Espaciadores de longitud creciente (~20 nucleótidos) para las sondas de cada tipo viral, con un sitio único de corte para *Bam* HI.
3. Validación *in silico* de las SP diseñadas

- a. Alineación de las secuencias lineales de los brazos yuxtapuestos de las sondas con las secuencias de los tipos virales de interés y sus variantes.
  - b. Heterodímeros, homodímeros y estructuras secundarias ausentes o irrelevantes.
4. Obtención y validación de los controles positivos (plásmidos con insertos de la región E6/E7 de VPH 16, 18 y 33)
  - a. Construcciones con los genomas virales completos de los tipos de VPH de referencia.
  - b. Preparaciones de los plásmidos y validación de los insertos de interés.
5. Montaje de los ensayos SP-RCA con los plásmidos de control y prueba preliminar con un raspado cervical con infección por VPH 16
  - a. Pre-RCA: hibridación/ligación de las sondas a las secuencias blanco.
  - b. RCA.
  - c. Generación exponencial de concatémeros.
  - d. Restricción con *Bam* HI.
  - e. Análisis electroforético de los monómeros.

## **Resultados y conclusiones principales**

Diseñamos sondas padlock específicas para VPH 16, 18, 33 y 45 de 96, 114, 132 y 153 nucleótidos, respectivamente, y probamos y validamos *in silico* las tres primeras. Obtuvimos clonas transformantes de *Escherichia coli* TOP10 que portan plásmidos con los genomas completos de VPH 16, 18 y 33 y preparaciones puras de los mismos. Montamos ensayos SP-RCA uniplex para VPH 16, 18 y 33 con el kit TempliPhi 100 o con ADN polimerasa  $\Phi$ 29 comercial (Pol  $\Phi$ 29). Demostramos que los ensayos permiten detectar infecciones por los tipos de VPH de interés, pues obtuvimos los monómeros esperados empleando como molde los plásmidos control y ADN de un raspado cervical con infección por VPH 16.

# Material y métodos

## Plásmidos con genomas completos de diversos tipos de VPH

Utilizamos una colección de plásmidos que portan genomas de diversos tipos de VPH donados por la Dra. Rocío Ortiz (UANL) y el Dr. Alejandro García Carrancá (UNAM) (Tabla 1). Caracterizamos 11 plásmidos de la Dra. Ortiz (pHPV5, pHPV6, pHPV7, pHPV11, pHPV16, pHPV18, pHPV31, pHPV32, pHPV33, pHPV35 y pHPV45) y seis del Dr. García Carrancá (pHPV66, pHPV58, pHPV67, pHPV31, pHPV53 y pHPV45). La concentración promedio de ADN de la colección fue 16 ng/ $\mu$ L.

## Transformación de *E. coli* TOP10

### ***Obtención de clonas transformantes***

Para recuperar los plásmidos, los disolvimos con TE, los mezclamos suavemente y los centrifugamos. Para la transformación por choque térmico a 42 °C, usamos células de *E. coli* TOP10 competentes criopreservadas, a las que añadimos caldo LB a 37 °C para su recuperación durante 1 h.

Las mezclas de transformación fueron sembradas en cajas de agar LB/IPTG-X-gal suplementadas con carbenicilina o kanamicina (Km) e incubadas en la oscuridad toda la noche a 37 °C. De cada caja fueron resembradas colonias resistentes a carbenicilina (Amp<sup>R</sup>) o kanamicina (Km<sup>R</sup>), aisladas mediante dos pases sucesivos en agar selectivo. Las colonias blancas seleccionadas fueron marcadas y almacenadas a 4 °C para luego caracterizarlas.

### ***Criopreservación de las clonas transformantes***

Las clonas transformantes fueron criopreservadas en LB-glicerol al 30%. A tubos Falcon de 15 mL añadimos 1.5 mL de caldo LB-carbenicilina (100  $\mu$ g/mL), inoculamos una asada de una colonia aislada y la incubamos a 37 °C con agitación a 225 rpm toda la noche. Al día siguiente, en condiciones asépticas añadimos un volumen de glicerol al 60% estéril, mezclamos suavemente, rotulamos el tubo y lo

**Tabla 1. Plásmidos con genomas completos de 14 tipos de VPH**

<b>Plásmido</b>	<b>Inserto (genoma viral)</b>	<b>Riesgo oncogénico</b>	<b>Fuente<sup>a</sup></b>
pHPV6	VPH 6	Bajo	RO
pHPV7	VPH 7	Bajo	RO
pHPV11	VPH 11	Bajo	RO
pHPV16	VPH 16	Alto	RO
pHPV18	VPH 18	Alto	RO
pHPV31	VPH 31	Alto	AGC
pHPV32	VPH 32	Bajo	RO
pHPV33	VPH 33	Alto	RO
pHPV45	VPH 45	Alto	AGC
pHPV5	VPH 5	Bajo	RO
pHPV53	VPH 53	Alto	AGC
pHPV58	VPH 58	Alto	AGC
pHPV66	VPH 66	Alto	AGC
pHPV67	VPH 67	Alto <sup>b</sup>	AGC

<sup>a</sup> RO, Dra. Rocío Ortiz (Universidad Autónoma de Nuevo León). AGC, Dr. Alejandro García Carrancá (Universidad Nacional Autónoma de México).

<sup>b</sup> Posible alto riesgo (Halec et al. 2014)

colocamos en el ultracongelador a -70 °C.

## **Amplificación de segmentos de los genes E6 y L1**

Los oligonucleótidos empleados en las mezclas de PCR fueron diseñados para amplificar segmentos del marco de lectura abierto (ORF) de los genes E6 y L1 de VPH. Para la región E6/E7 utilizamos los oligonucleótidos consenso de Sotlar et al. (2004) (0.30  $\mu$ M cada uno) que generan un producto de ~630 pb en la PCR directa, y cuatro cocteles de oligonucleótidos consenso que generan amplicones tipo-específicos de diferentes tamaños en la PCR multiplex anidada (PCR-MA). La pareja de oligonucleótidos MY09/11 (0.20  $\mu$ M cada uno) de Manos et al. (1989) amplifica un producto de ~450 pb del ORF L1. Otros oligonucleótidos para la región E6/E7 fueron la pareja LCRS/7AS (0.20  $\mu$ M cada uno) de Noda et al. (1998) que amplifica un producto de ~650 pb. Para la región E6/E7 de VPH33 empleamos la pareja formada por el oligonucleótido reverso tipo-específico de Sotlar et al. (2004) y el oligonucleótido HPVI33-F de Ricardo Uribe (comunicación personal) (0.30  $\mu$ M cada uno) que amplifica un segmento de ~540 pb. Las reacciones se llevaron a cabo en un Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems), con placa para 96 tubos.

## **Caracterización de los plásmidos**

### ***Preparaciones de ADN plasmídico***

Obtuvimos el ADN plasmídico por el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979). Cultivamos las clonas en caldo LB a 37 °C con agitación toda la noche, sedimentamos las células por centrifugación a 8,000 rpm por 3 min, descartamos el sobrenadante, agregamos a la pastilla 100  $\mu$ L de solución 1 (glucosa 50 mM, Tris 25 mM y EDTA 10 mM pH 8.0, con 9 mg/mL de RNasa). Resuspendimos la pastilla por agitación vigorosa por 2 s e incubamos la mezcla por 3 min a temperatura ambiente para digerir el RNA. Añadimos 200  $\mu$ L de solución 2 fresca (SDS 1%/NaOH 0.1 N) e invertimos la mezcla suavemente hasta que quedó translúcida. Añadimos 150  $\mu$ L de solución 3 (acetato de potasio 3 M pH 5), mezclamos por inversión suave y sumergimos el tubo en hielo por 3 min para precipitar el dodecil

sulfato de potasio. Centrifugamos a 13,000 rpm por 3 min y pasamos el sobrenadante a un tubo de microcentrífuga nuevo. Añadimos 900  $\mu$ L de etanol absoluto y colocamos el tubo por 3 min en hielo para precipitar el ADN. Centrifugamos a 13,000 rpm por 5 min. Descartamos el sobrenadante y a la pastilla añadimos 500  $\mu$ L de etanol al 70% para lavarla. Centrifugamos a 13,000 rpm por 2 min y descartamos el sobrenadante. Repetimos el paso una vez más. Secamos el tubo por inversión sobre una toalla de papel absorbente. Añadimos 50  $\mu$ L de TE pH 8.0 para disolver la pastilla. Finalmente cuantificamos el ADN (Tabla 4), rotulamos el tubo, y lo almacenamos a -20 °C. Inmediatamente antes de usar el ADN, descongelamos el tubo por inmersión en hielo.

### ***Análisis de restricción***

Analizamos los genomas contenidos en las preparaciones de los plásmidos con la herramienta NEBcutter 2 para determinar las endonucleasas que generen un solo corte en los genomas virales insertados en pHPV16 y pVPH33 y un corte en cada extremo del genoma viral insertado en pHPV18. Así seleccionamos *Bam* HI para pHPV16 y pHPV18 y *Bgl* II para pHPV33 (Tabla 5). Cada plásmido fue digerido por 2 h a 37 °C con 1 U/ $\mu$ L de *Bam* HI y 0.5 U/ $\mu$ L de *Bgl* II.

### ***Amplicones de los ORF L1 y E6***

Para caracterizar los plásmidos usamos el ADN purificado como molde en mezclas de PCR directa y PCR-MA (Tabla 6). Preparamos mezclas para PCR directa del ORF L1 para amplificar segmentos de ~450 pb con los oligonucleótidos MY09/11 0.20  $\mu$ M (Manos et al. 1989) a partir de pHPV16, pHPV18, pHPV33, pHPV45, pHPV31, pHPV32, pHPV66, pHPV58, pHPV5, pHPV6 y pHPV7.

Preparamos mezclas para PCR del ORF E6 con oligonucleótidos consenso 0.30  $\mu$ M de Sotlar et al. (2004) para generar los productos de ~630 pb, seguidas de una segunda PCR (anidada) con los oligonucleótidos tipo-específicos a la misma concentración.

### ***Secuenciación de los insertos de pHPV16, pHPV18 y pHPV33***

Para la secuenciación en el LANBAMA requeríamos oligonucleótidos que flanquearan la región que abarca el extremo terminal 3' del ORF E6 y una porción

inicial del ORF E7, de interés para futuros ensayos. Con pHPV16 utilizamos los oligonucleótidos LCRS/7AS (Noda et al. 1998) para generar el producto de 650 pb. Para pHPV18, los oligonucleótidos consenso GPE6-3F y GPE7-6B (Sotlar et al. 2004) para generar el producto de 630 pb. Para pHPV33, los oligonucleótidos HPV133-F (Ricardo Uribe, comunicación personal) y HPV33-R (Sotlar et al. 2004) para generar el producto de 540 pb.

Las secuencias del ORF E6 de los plásmidos fueron alineadas mediante Blastn con la secuencia de referencia de los genomas respectivos: la de pHPV16 con la secuencia de referencia NC\_001526.2; la de pHPV18 con la secuencia de referencia AY262282.1; la de pHPV33 con la secuencia de referencia M12732.1.

La secuencia de pHPV16 fue traducida *in silico* para determinar la secuencia de aminoácidos asociada al cambio de triplete observado al final del ORF E6.

## **Sondas padlock**

### ***Características de las sondas***

Las sondas fueron diseñadas para hibridar cerca del extremo 3' de los ORF E6 de VPH16, 18, 33 y 45 y sintetizadas por Integrated DNA Technologies (IDT).

El tamaño de las sondas para cada tipo viral fue diferente. La longitud de los brazos de anclaje fue de 19 a 29 nt, la de los brazos de extensión de 19 a 25 nt y la de las secuencias espaciadoras de 52 a 110 nt (con incrementos de longitud sucesivos de ~20 nt) contenían la secuencia de un sitio único de corte para *Bam* HI en la forma amplificada (i.e. ADN de cadena doble).

La longitud total de las sondas fue: SP-VPH16, 96 nt; SP-VPH18, 114 nt; SP-VPH33, 132 nt; SP-VPH45, 153 nt.

### ***Análisis bioinformático de las sondas***

Para validar el diseño de las sondas usamos cuatro herramientas bioinformáticas: 1) idtdna, para predecir la formación de homodímeros y heterodímeros, 2) mfold, para simular las estructuras secundarias, 3) NEB cutter, para simular el corte con *Bam* HI de las sondas y los genomas de los cuatro tipos virales de interés, y 4) Blastn, para alinear tanto las secuencias lineales de los brazos de anclaje y



extensión yuxtapuestos como las secuencias espaciadoras de cada sonda con las secuencias del GenBank, con las secuencias de las variantes de los cuatro tipos de VPH y con las secuencias de los plásmidos.

### ***Manejo de las sondas***

Las sondas liofilizadas (20 nmolas), fueron disueltas con 1 mL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) para obtener las soluciones madre respectivas con concentraciones ~20  $\mu$ M. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en criotubos de 2 mL con 100  $\mu$ L de TE para obtener concentraciones ~1  $\mu$ M que fueron almacenadas a -20 °C y descongeladas a 4 °C y mantenidas en hielo al momento de ser utilizadas.

## **Ensayos SP-RCA**

### ***Ensayo preliminar de SP-VPH16***

Las mezclas de RCA para este ensayo contenían únicamente SP-VPH16 (1  $\mu$ M) y la secuencia blanco en tres modalidades: 1) 17.4 ng del amplicón E6-457 (i.e., lineal), 2) 19.9 ng de pHPV16 intacto, 3) 19.9 ng de pHPV16 linearizado por restricción con *Bam* HI (0.4 U/  $\mu$ L).

El ensayo de RCA, con el kit TempliPhi 100 se inició con la desnaturalización térmica del ADN en sus tres modalidades, continuó con la hibridación de la sonda a la secuencia blanco, seguida de circularización de la sonda con ligasa T4, pre-RCA (desnaturalización para separar la sonda del ADN problema), incubación por 18 h, restricción de las mezclas con *Bam* HI y electroforesis en geles de agarosa para monómeros con el tamaño esperado de 96 pb.

### ***Ensayos con TempliPhi 100 y Pol $\Phi$ 29***

La sonda SP-HPV16 se ensayó luego en mezclas con el kit TempliPhi 100 o con Pol  $\Phi$ 29.

Para determinar la cantidad mínima de sonda amplificable, con ADN blanco desnaturalizado usamos las mismas condiciones para la hibridación y ligación de la sonda y pre-RCA. Preparamos mezclas de RCA con pHPV16, TempliPhi 100 y diluciones logarítmicas seriadas de SP-VPH16 ( $10^7$ - $10^{11}$  moléculas) por 4 h para

generar concatémeros (ADN de cadena doble) a partir de las sondas circularizadas. *Bam* HI (1 U/  $\mu$ L) fue añadida para cortar los concatémeros y obtener monómeros que fueron separados por electroforesis en geles de agarosa para determinar su tamaño.

Otras mezclas sin dilución con sondas SP-VPH18 y SP-VPH33 y RCA por 18 h fueron probadas en las condiciones del ensayo anterior. Con Pol  $\Phi$ 29 las tres sondas SP-VPH16, SP-VPH18 y SP-VPH33 (1  $\mu$ M), en la pre-RCA (con hexámeros aleatorios 100  $\mu$ M), incubadas 18 h con Pol  $\Phi$ 29 0.1x; *Bam* HI (1 U/ $\mu$ L) fueron añadidas para obtener monómeros que luego fueron separados por electroforesis para determinar su tamaño.

### ***Ensayo de un raspado cervical con VPH 16***

El ADN del raspado DVR (iniciales del nombre de la paciente), diagnosticado previamente con infección única por VPH 16 fue empleado como blanco en un ensayo para SP-VPH16 con Pol  $\Phi$ 29 0.1x e incubado 2.5 h o 18 h bajo las condiciones de los ensayos previos, para ver si podíamos reducir sustancialmente el tiempo de incubación.

# Resultados

## **Clonas de *E. coli* TOP 10 transformadas con plásmidos que portan genomas completos de VPH**

Para poder utilizarlos como controles, verificamos los plásmidos con genomas completos de 14 tipos de VPH de alto y bajo riesgo con el método de Sotlar et al. (2004) y los usamos para obtener células de *E. coli* TOP10 transformadas por choque térmico.

Sembramos las mezclas de transformación en cajas de agar LB suplementadas con carbenicilina y kanamicina. De cada caja seleccionamos y resembramos colonias aisladas mediante dos pases sucesivos en agar selectivo y las caracterizamos mediante PCR con los métodos de Manos et al. (1989) y Sotlar et al. (2004) (Tabla 2).

Con los 14 plásmidos probados obtuvimos y aislamos clonas transformantes candidato resistentes a carbenicilina (Amp<sup>R</sup>) y kanamicina (Km<sup>R</sup>): 12 Lac<sup>-</sup> (blancas) con pHPV16, pHPV18, pHPV33, pHPV45, pHPV32, pHPV31, pHPV66, pHPV58, pHPV5, pHPV6, pHPV7, pHPV11 y dos Lac<sup>+</sup> (azules) con pHPV53 y pHPV67 (Tabla 3).

## **Obtención y caracterización de pHPV16, pHPV18 y pHPV33**

### ***Preparaciones de los plásmidos de interés***

Extrajimos el ADN plasmídico de las 14 clonas candidato (Tabla 1) que podrían ser utilizados en este trabajo y en trabajos futuros. Fue de buena calidad solamente el ADN extraído de las clonas que portan plásmidos con los genomas completos de VPH 16, 18 y 33, pero no el de VPH 45 (Tabla 4), por lo cual continuamos el trabajo solamente con pHPV16, pHPV18 y pHPV33, los plásmidos con los insertos de interés para este trabajo.

La electroforesis de las preparaciones de plásmidos intactos (“superenrollados”) en TAE-agarosa al 0.8% dio bandas con tamaños aparentes de 7.6 kb para pHPV18 y de 10 kb para pHPV16 y pHPV33 (Fig. 2).

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados y tamaño de los amplicones esperados**

Secuencia blanco	Oligonucleótido		Amplicón		Referencias
	Nombre	Secuencia (5' → 3')	T <sub>m</sub> (°C)	(pb)	
L1	MY09	CGTCCAAAAGGAAACTGAGC	54.2	450	Manos et al. (1989)
	MY11	GCACAGGGACATAACAATGG	53.9		
E6/E7	GP-E6-3F	GGGWGK KACTGAAATCGGT	57.2	630	Sotlar et al. (2004)
	GP-E7-5B	CTGAGCTGTCARNTAATTGCTCA	57.1		
	GP-E7-6B	TCCTCTGAGTYGYCTAATTGCTC	58.5		
	LCRS	AAGGGAGTAACCGAAAACGGT	56.4	650	Noda et al. (1998)
	E7AS	TCATCCTCCTCCTCTGAG	52.3		
	HPVI33-F <sup>a</sup>	GTAGGGTGTAACCGAAAGCGGTTCC	59.7	540	R. Uribe <sup>b</sup>
	HPV33-R <sup>a</sup>	GTTTTTACACGTCACAGTGCA	53.8		Sotlar et al. (2004)

<sup>a</sup> Para la región E6 de VPH 33.

<sup>b</sup> Comunicación personal.

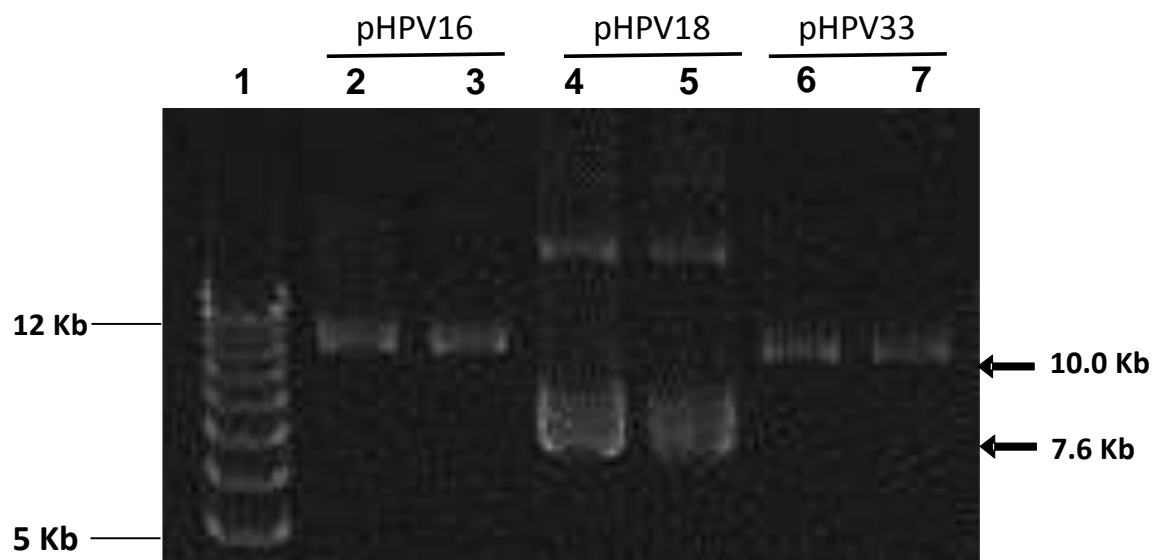
**Tabla 3. Clonas transformantes de *E. coli* TOP 10 obtenidas**

Clona	Plásmido	Fenotipo
CG100	pHPV16	Lac-
CG101	pHPV18	Lac-
CG102	pHPV33	Lac-
CG108	pHPV31	Lac-
CG103	pHPV32	Lac-
CG105	pHPV6	Lac-
CG110	pHPV58	Lac-
CG107	pHPV45	Lac-
CG109	pHPV66	Lac-
CG104	pHPV5	Lac-
CG106	pHPV7	Lac-
CG111	pHPV11	Lac-
CG112	pHPV67	Lac+
CG113	pHPV53	Lac+
CG114	pHPV16	Lac-
CG115	pHPV18	Lac-

Todas las clonas fueron Amp<sup>R</sup> y Km<sup>R</sup>.

**Tabla 4. Preparaciones de plásmidos obtenidos de las clonas transformantes**

Clona	Plásmido	A <sub>260</sub> /A <sub>280</sub>	ADN (ng/μL)
CG100	pHPV16	1.97	1098.6
CG101	pHPV18	1.95	680.2
CG102	pHPV33	1.95	879.0
CG103	pHPV32	1.90	55.0
CG104	pHPV5	1.90	193.0
CG105	pHPV6	2.00	92.3
CG106	pHPV7	1.90	101.5
CG107	pHPV45	1.90	68.2
CG108	pHPV31	1.90	188.8
CG109	pHPV66	2.00	110.9
CG110	pHPV58	1.70	42.33
CG111	pHPV11	1.90	83.6
CG114	pHPV16	1.80	60.3
CG115	pHPV18	1.90	41.7



**Fig. 2. Preparaciones de plásmidos con genomas completos de VPH 16, 18 y 33**

Gel TAE-agarosa al 0.8% de 0.5 cm de espesor. (A) Carril 1, escalera 5-12 kb. Carriles 2 y 3, pHPV16 (10.0 kb). Carriles 4 y 5, pHPV18 (7.6 kb). Carriles 6 y 7, pHPV33 (10.0 kb).

### **Análisis de restricción de los plásmidos de interés**

Para inferir el tamaño de los vectores de pHPV16, pHPV18 y pHPV33 supusimos que el tamaño de los insertos es el del genoma completo de cada tipo de VPH (i.e., 7.9 kb).

Digerimos pHPV16 con *Bam* HI (sitio de corte único en el genoma viral), pHPV18 con *Bam* HI (dos sitios de corte en los extremos del genoma viral) y pHPV33 con *Bgl* II (un sitio de corte en el genoma viral) (Fig. 3).

pHPV16 tratado con *Bam* HI dio dos fragmentos de 8.0 y 4.0 kb (total 12.0 kb, vector 4.0 kb); pHPV18 con *Bam* HI dio dos fragmentos de 6.7 y 2.9 kb (total 9.6 kb, vector 1.7 kb); pHPV33 con *Bgl* II dio dos fragmentos de 7.9 y 3.8 kb (total 11.7 kb, vector 3.8 kb) (Tabla 5).

Los tamaños de pHPV16, pHPV18 y pHPV33 son por tanto de 12.0, 9.6 y 11.7 kb, respectivamente.

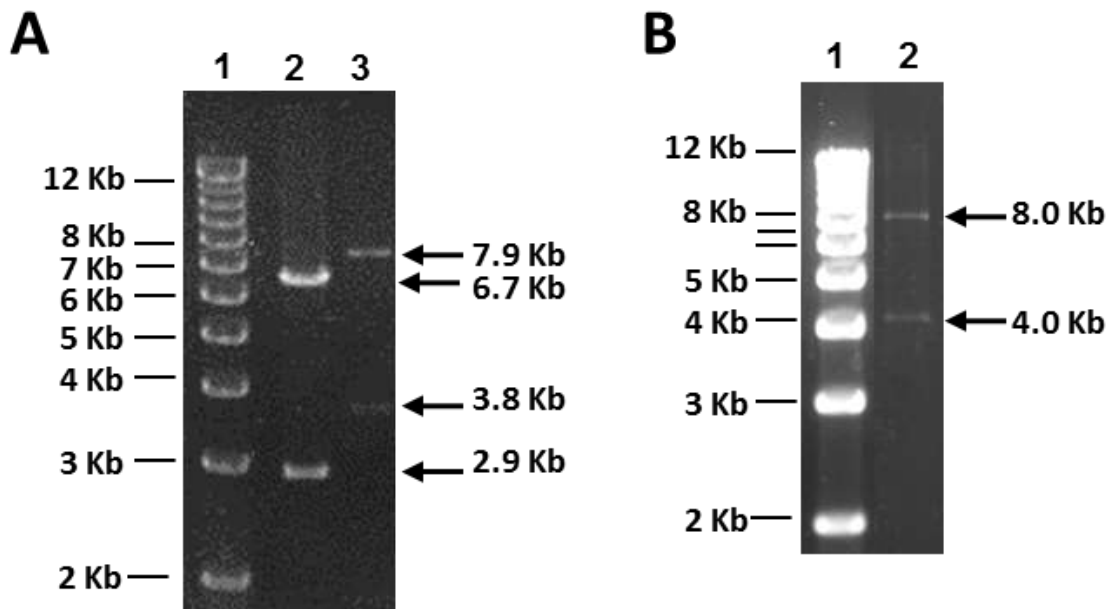
### **Amplicones de los ORF L1 y E6 generados a partir de los plásmidos**

Para verificar si los plásmidos aislados de 13 de las 14 clonas permiten generar amplicones virales L1 (450 pb) y E6 (630 pb), obtuvimos ADN de pHPV16, pHPV18, pHPV33, pHPV45, pHPV31, pHPV32, pHPV66, pHPV58, pHPV5, pHPV6, pHPV7. Con los plásmidos purificados preparamos mezclas para PCR directa del ORF L1 con oligonucleótidos MY09/11 (Manos et al. 1989) y PCR-MA del ORF E6 (Sotlar et al. 2004) (Tabla 2).

Las 13 clonas seleccionadas (Tabla 6) fueron positivas para L1 y para E6 específico de los tipos de VPH 16, 18, 33, 32, 6, 31 y 58, por lo cual parecen contener genomas completos de esos tipos virales. Cuatro clonas fueron L1 positivas pero E6-negativas para VPH 45, 66, 5 y 7 (Figs. 4-6).

### **Secuencias de los ORF E6/E7 de pHPV16, pHPV18 y pHPV33**

Para verificar si las secuencias de los ORF E6 de los genomas de VPH 16, 18 y 33 de los plásmidos que pudimos amplificar coinciden con las de los tipos de referencia registrados en GenBank y con las de las sondas padlock, secuenciamos y alineamos con Blastn el amplicón de pHPV16 (650 pb) generado con los oligonucleótidos LCRS/7AS (Noda et al. 1998), el de pHPV18 (630 pb)



**Fig. 3. Fragmentos de restricción de pHPV16, pHPV18 y pHPV33**

Gel TAE-agarosa al 0.8% de 0.5 cm de espesor. (A) Carril 1, escalera 2-12 kb. Carril 2, pHPV18 digerido con *Bam* HI (6.7 y 2.9 kb). Carril 3, pHPV33 digerido con *Bgl* II (7.9 y 3.8 kb). (B) Carril 1, escalera 2-12 kb. Carril 2, pHPV16, digerido con *Bam* HI (8.0 y 4.0 kb).

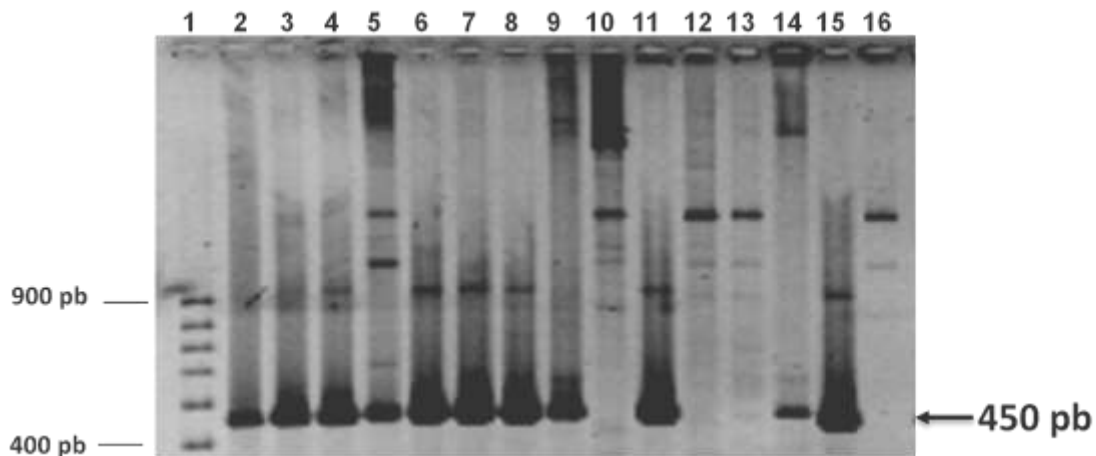
**Tabla 5. Fragmentos de restricción de pHPV16, pHPV18 y pHPV33**

Plásmido	Restricción		Tamaño estimado (kb) <sup>a</sup>		
	Enzima	Fragmentos (kb)		Total	Vector
		I	II		
pHPV16	<i>Bam</i> HI	8.0	4.0	12.0	4.0
pHPV18	<i>Bam</i> HI	6.7	2.9	9.6	2.9
pHPV33	<i>Bgl</i> II	7.9	3.8	11.7	3.8

<sup>a</sup> Suponiendo que el genoma completo de VPH es de 8 kb.

**Tabla 6. Amplificación de los ORF E6/E7 y L1 mediante PCR de colonia de las clonas transformantes**

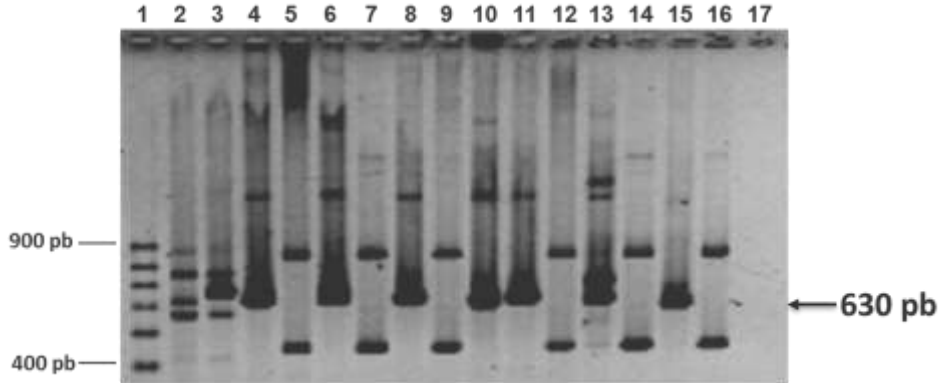
Clona	ORF	
	E6	L1
CG100 (pHPV16)	Sí	Sí
CG101 (pHPV18)	Sí	Sí
CG102 (pHPV33)	Sí	Sí
CG108 (pHPV31)	Sí	Sí
CG103 (pHPV32)	Sí	Sí
CG105 (pHPV6)	Sí	Sí
CG110 (pHPV58)	Sí	Sí
CG107 (pHPV45)	No	Sí
CG109 (pHPV66)	No	Sí
CG104 (pHPV5)	No	Sí
CG106 (pHPV7)	No	Sí
CG114 (pHPV16)	Sí	Sí
CG115 (pHPV18)	Sí	Sí



**Fig. 4. Amplicones del ORF L1 (~450 pb) iniciados con la pareja MY09/11 a partir de ADN de células SiHa, HeLa o plásmidos con genomas completos de diversos tipos de VPH**

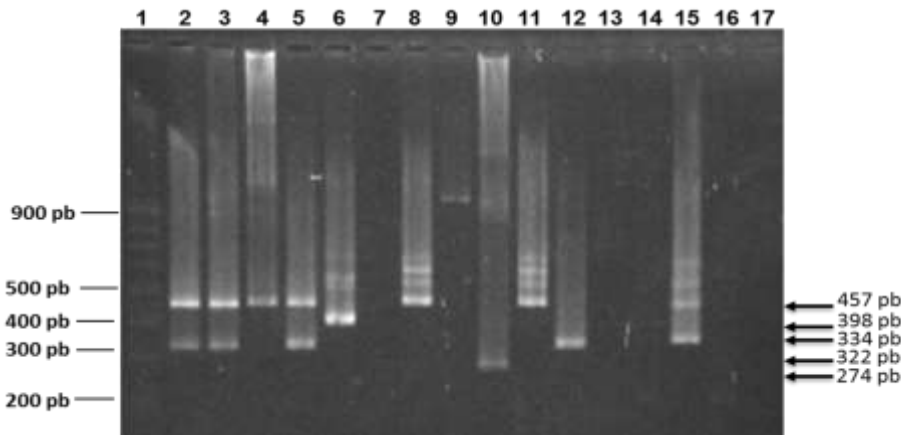
Gel SB-agarosa al 1.5% de 0.5 cm de espesor. Carril 1, escalera 100 pb. Carril 2, ADN de células SiHa (VPH 16). Carril 3, ADN de células HeLa (VPH 18). Carril 4, pHPV16. Carril 5, pHPV18. Carril 6, pHPV33. Carril 7, pHPV45. Carril 8, pHPV31. Carril 9, pHPV66. Carril 10, pHPV58. Carril 11, pHPV16. Carril 12, pHPV18. Carril 13, pHPV32. Carril 14, pHPV5. Carril 15, pHPV6. Carril 16, pHPV7.





**Fig. 5. Amplicones de la región E6/E7 (~630 pb) generados con los iniciadores consenso (GP-E6-3F, GP-E7-5B y GP-E7-6B) de Sotlar et al. (2004) a partir de plásmidos con genomas de diversos tipos de VPH**

Gel SB-agarosa al 1.5% de 0.5 cm de espesor. Carril 1, escalera 100 pb. Carril 2, ADN de células SiHa (VPH16). Carril 3, ADN de células HeLa (VPH18). Carril 4, pHPV16. Carril 5, pHPV18. Carril 6, pHPV33. Carril 7, pHPV45. Carril 8, pHPV31. Carril 9, pHPV66. Carril 10, pHPV58. Carril 11, pHPV16. Carril 12, pHPV18. Carril 13, pHPV32. Carril 14, pHPV5. Carril 15, pHPV6. Carril 16, pHPV7. Carril 17, control negativo sin ADN.



**Fig. 6. Amplicones de la región E6/E7 generados por PCR multiplex anidada a partir de plásmidos con el genoma completo de diversos tipos de VPH**

Gel SB-agarosa al 1.5% de 0.5 cm de espesor. Carril 1, escalera 100 pb. Carril 2, ADN de células SiHa (VPH16). Carril 3, ADN de células HeLa (VPH18). Carril 4, pHPV16. Carril 5, pHPV18. Carril 6, pHPV33. Carril 7, pHPV45. Carril 8, pHPV31. Carril 9, pHPV66. Carril 10, pHPV58. Carril 11, pHPV16. Carril 12, pHPV18. Carril 13, pHPV32. Carril 14, pHPV5. Carril 15, pHPV6. Carril 16, pHPV7. Carril 17, control negativo sin ADN.

generado con los oligonucleótidos consenso GPE6-3F/GPE7-6B (Sotlar et al. 2004), y el de pHPV33 (540 pb) generado con los oligonucleótidos HPVI33-F/HPV33-R (Fig. 7).

La secuencia del ORF E6 de pHPV16 (Fig. 8) corresponde al genoma de referencia de VPH 16 (GenBank NC\_001526.2), excepto por un cambio de triplete GAG por CGT cerca del extremo 3' (nucleótidos 868, 869 y 870) (Fig. 9) que codifica ácido glutámico (E) en lugar de arginina (R) y es seguido por un codón de paro (Fig. 10A); después del triplete R en la secuencia de referencia (nucleótidos 455 y 456) continúan los tripletes para cinco aminoácidos más (RETQL) (Fig. 10B).

La secuencia del ORF E6 de pHPV18 corresponde al genoma de referencia de VPH 18 (GenBank AY262282.1) (Fig. 11), excepto por el cambio de una C por G (nucleótido 183) probablemente silencioso, pues el codón de referencia CCG codifica prolina (P) igual que el CCC del plásmido (Fig. 12).

La secuencia del ORF E6 de pHPV33 es idéntica a la del genoma de referencia de VPH 33 (GenBank M12732.1) (Figs. 13 y 14).

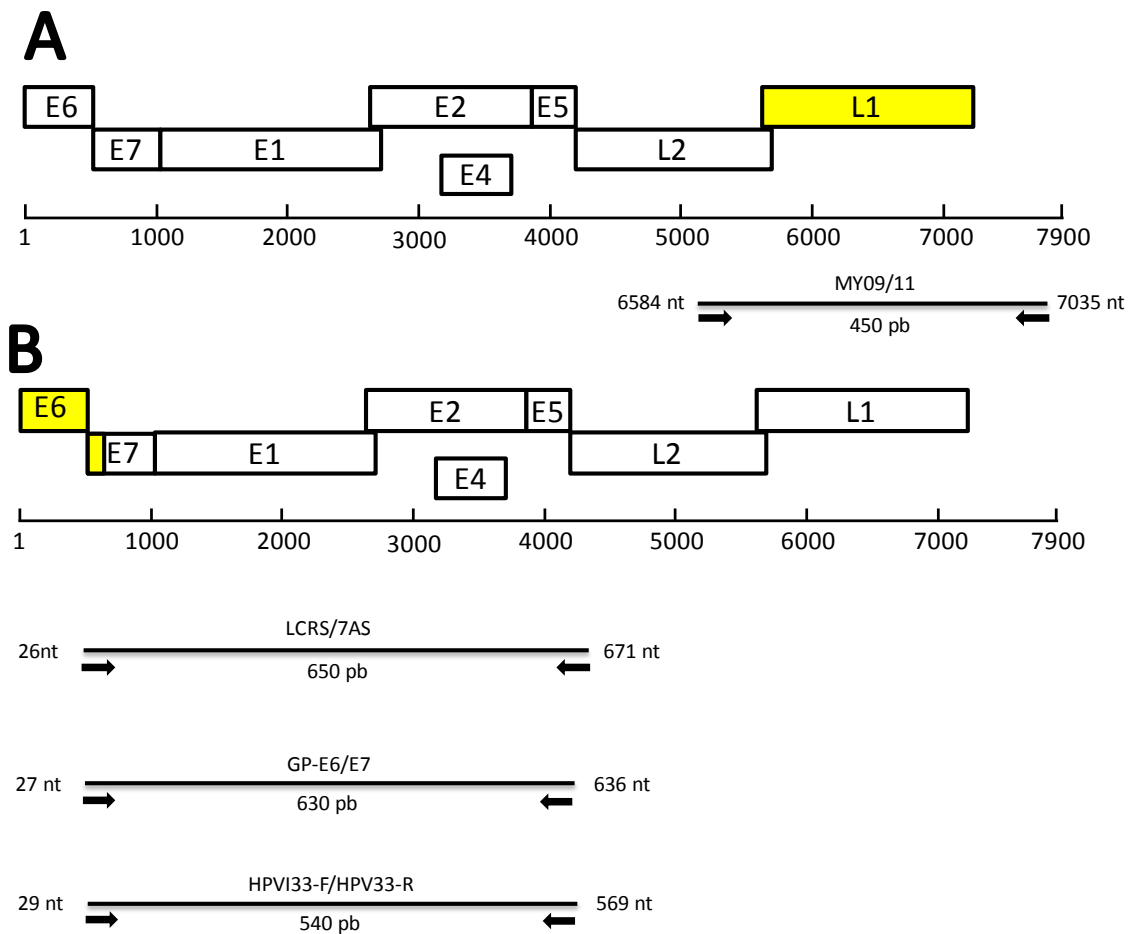
Concluimos que los plásmidos de interés (pHPV16, pHPV18 y pHPV33) contienen los ORF E6 de los tipos de VPH de referencia correspondientes y podrían emplearse en los ensayos SP-RCA, aunque la hibridación de SP-VPH16 discrepa en una base con la secuencia de referencia.

## **Sondas padlock para los ORF E6 de VPH 16, 18, 33 y 45**

### ***Diseño***

Para diseñar las sondas empleamos cuatro métodos bioinformáticos sucesivos que permitieron 1) seleccionar las secuencias blanco en los ORF E6 de los tipos de VPH de interés, 2) diseñar los brazos de extensión y anclaje de las sondas padlock tipo-específicas, 3) diseñar los elementos espaciadores de longitud característica tipo-específica con un sitio *Bam* HI único, y 4) prevenir la formación de heterodímeros, homodímeros y estructuras secundarias en las sondas.

Las secuencias de los ORF E6 de los tipos de VPH de interés fueron alineadas y sus regiones variables cercanas al extremo 3' analizadas para



**Fig. 7. Oligonucleótidos empleados para la detección de VPH basada en el tamaño de los productos de amplificación de los ORF L1 y E6**

La parte superior de los paneles A y B representa el genoma de VPH de forma lineal. Los bloques muestran los genes virales a escala y su ubicación en el genoma. Los genes E6, E7 y L1 están resaltados en amarillo. Las pruebas de detección se muestran bajo cada mapa y en ellas se indica el nombre y longitud (pb) del amplicón respectivo y la ubicación de los nucleótidos inicial y final en el genoma viral. (A) Detección del ORF L1 con los oligonucleótidos MY09/11 (amplicón de 450 pb, nt 6584-7035). (B) Detección de la región E6/E7 con los oligonucleótidos LCRS/7AS (amplicón de 650 pb, nt 26-671), GP-E6/E7 (amplicón de 630 pb, nt 27-636) y HPVI33-F/HPV33-R (amplicón de 540 pb, nt 29-569).

```

TCAAACCCAA TTTCCATTTG TTTTTTTTAC AACTGCACTA TTGTGCAACT ACTTGAAATC
ACTTATGTAC ATTGTGTCAT ATAAAATAAA TTCACTATGC GCCAACGCCT TACATACCGC
TGTTAGGCAC ATATTTTTGG CTTGTTTTAA CTAACCTAAT TGCATATTTG GCATAAGGTT
TAAACTTCTA AGGCCAACTA AATGTCACCC TAGTTCATAC ATGAACTGTG TAAAGGTTAG
TCATACATTG TTCATTTGTA AAAGTGCACA TGGGTGTGTG CAAACCGTTT TGGGTTACAC
ATTTACAAGC AACTTATATA ATAATACTAA ATTACAATAA TTCATGTATA AAATAAGGG
CGTAACCGAA ATCGGTTGAA CCGAAACCGG TTAGTATAAA AGCAGACATT TTATGCACCA
AAAGAGAACT GCAATGTTTC AGGACCCACA GGAGCGACCC AGAAAGTTAC CACAGTTATG
CACAGAGCTG CAAACAATA TACATGATAT AATATTAGAA TGTGTGTACT GCAAGCAACA
GTTACTGCGA CGTGAGGTAT ATGACTTTGC TTTTCGGGAT TTATGCATAG TATATAGAGA
TGGGAATCCA TATGCTGTAT GTGATAAATG TTTAAAGTTT TATTCTAAAA TTAGTGAGTA
TAGACATTAT TGTTATAGTT TGTATGGAAC AACATTAGAA CAGCAATACA ACAAACCGTT
GTGTGATTTG TTAATTAGGT GTATTAAGT TCAAAAAGCCA CTGTGTCCTG AAGAAAAGCA
AAGACATCTG GACAAAAAGC AAAGATTCCA TAATATAAGG GGTCGGTGGA CCGGTCGATG
TATGTCTTGT TGCAGATCAT CAAGAACAGA GTAGAGAAAC CCAGCTGTAA TCATGCATGG
AGATACACCT ACATTGCATG AATATATGTT AGATTTGCAA CCAGAGACAA CTGATCTCTA
CTGTTAGAGC CAATTTTTT

```

**Fig. 8. Secuencia de la región E6/E7 de pHPV16 (980 pb)**

La secuencia completa del ORF E6 (462 pb), resaltada en gris, empieza con el primer codón de inicio **ATG**, tiene el triplete **GAG (subrayado)** en lugar del codón CGT de la secuencia de referencia NC\_001526.2 inmediatamente antes del codón de paro **TAG**, ambos señalados con negritas. La secuencia parcial del ORF E7 (88 pb), resaltada en verde, empieza a partir del segundo codón **ATG**, también señalado con negritas.

```

Query 1   ATGCACCAAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAAGTTACCA 60
          |||
Sbjct 413 ATGCACCAAAAAGAGAACTGCAATGTTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAAGTTACCA 472

Query 61  CAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGC 120
          |||
Sbjct 473  CAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACATACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGC 532

Query 121 AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA 180
          |||
Sbjct 533  AAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTA 592

Query 181 TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT 240
          |||
Sbjct 593  TATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAATGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATT 652

Query 241 AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC 300
          |||
Sbjct 653  AGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGTTTGTATGGAACAACATTAGAACAGCAATACAAC 712

Query 301  AAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAAAGCCACTGTGTCCTGAA 360
          |||
Sbjct 713  AAACCGTTGTGTGATTTGTTAATTAGGTGTATTAAGTGTCAAAAAGCCACTGTGTCCTGAA 772

Query 361  GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC 420
          |||
Sbjct 773  GAAAAGCAAAGACATCTGGACAAAAGCAAAGATTCCATAATATAAGGGGTCGGTGGACC 832

Query 421  GGTTCGATGTATGCTTGTTGCAGATCATCAAGAACAC -GTAGAGAAACCCAGCTGTAA 477
          |||
Sbjct 833  GGTTCGATGTATGCTTGTTGCAGATCATCAAGAACAGAGTAGAGAAACCCAGCTGTAA 890

```

**Fig. 9. Alineación de la secuencia del ORF E6 de VPH 16 de referencia con la secuencia de PHPV16 (462 pb)**

La secuencia del ORF de VPH 16 (GenBank NC\_001526.2) fue alineada con la de PHPV16 (462 pb). El cuadro muestra el cambio de nucleótido identificado; 99% de identidad, Query cover 100%.

## A

ORF E6 pHPV16 sequence | 153 aa

```
MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYC  
KQQLLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKI  
SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPE  
EKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTE
```

## B

ORF E6 HPV16 GenBank sequence database | 158 aa

```
MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYC  
KQQLLRREVDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYSKI  
SEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDLLIRCINCQKPLCPE  
EKQRHLDKKQRFHNIRGRWTGRCMSCCRSSRTRRETQL
```

**Fig. 10. Diferencias en las secuencias de aminoácidos de las oncoproteínas E6 codificadas en el genoma de referencia de VPH 16 (474 pb) y en pHPV16 (459 pb)**

Las secuencias nucleotídicas del ORF E6 prototípico de VPH 16 y de pHPV16 fueron traducidas *in silico* como secuencias de aminoácidos. (A) Secuencia de 153 aminoácidos de la oncoproteína E6 de pHPV16. (B) Secuencia de 158 aminoácidos de la oncoproteína E6 de VPH 16 prototípico (GenBank NC\_001526.2), que contiene seis aminoácidos adicionales en la porción carboxilo terminal a partir de la treonina 152 (T152).

```

ATGGCGCGCT TTGAGGATCC AACACGGCGA CCCTACAAGC TACCTGATCT GTGCACGGAA
CTGAACACTT CACTGCAAGA CATAGAAATA ACCTGTGTAT ATTGCAAGAC AGTATTGGAA
CTTACAGAGG TATTTGAATT TGCATTTAAA GATTTATTTG TGGTGTATAG AGACAGTATA
CCCATGCTG CATGCCATAA ATGTATAGAT TTTTATTCTA GAATTAGAGA ATTAAGACAT
TATTCAGACT CTGTGTATGG AGACACATTG GAAAACTAA CTAACACTGG GTTATACAAT
TTATTAATAA GGTGCCTGCG GTGCCAGAAA CCGTTGAATC CAGCAGAAAA ACTTAGACAC
CTTAATGAAA AACGACGATT TCACAACATA GCTGGGCACT ATAGAGGCCA GTGCCATTCCG
TGCTGCAACC GAGCACGACA GGAACGACTC CAACGACGCA GAGAAACACA AGTATAA

```

**Fig. 11. Secuencia del ORF E6 de pHPV18 (477 pb)**

La secuencia completa de la región E6/E7 de pHPV18 (477 pb) empieza con el codón de inicio ATG y termina con el codón de paro TAA y tiene una C en lugar de una G en la posición 183 (indicada por una letra negra resaltada en gris) respecto a la secuencia de referencia (GenBank AY262282.1).



**Fig. 12. Alineación de la secuencia de la región E6 de VPH 18 de referencia con la de pHPV18 (477 pb)**

La secuencia del ORF de VPH 18 (GenBank AY262282.1) fue alineada con la de pHPV18 (477 pb). El cuadro rojo muestra el cambio de nucleótido identificado; 99% de identidad, Query cover 100%.

```

ATCAGGCATA TATAGCACCA TTTTGCAGTA AGGTAAGTCA CGACTATGTT TCAAGACACT
GAGGAAAAAC CACGAACATT GCATGATTTG TGCCAAGCAT TGGAGACAAC TATACACAAC
ATTGAACTAC AGTGCCTGGA ATGCAAAAAA CCTTTGCAAC GATCTGAGGT ATATGATTTT
GCATTTGCAG ATTTAACAGT TGTATATAGA GAGGGAAATC CATTGGGAAT ATGTAAACTG
TGTTTGCAGT TCTTATCTAA AATTAGTGAA TATAGACATT ATAATTATTC TGTATATGGA
AATACATTAG AACAAACAGT TAAAAAACCT TTAAATGAAA TATTAATTAG GTGTATTATA
TGCAAAAGAC CTTTGTGTCC TCAAGAAAAA AAACGACATG TGGATTTAAA CAAACGATTT
CATAATATTT CGGGTCGTTG GGCAGGGCGC TGTGCGGCGT GTTGGAGGTC CCGACGTAGA
GAAACTGCAC TGTGACGTGT AAAAAACAA CAAA

```

**Fig. 13. Secuencia de la región E6 de pHPV33 (514 pb)**

La secuencia completa del ORF E6 (450 pb), resaltada en gris, empieza con el primer codón de inicio **ATG** y termina con el codón de paro **TGA**, señalados con negritas. Secuencia de referencia GenBank M12732.1.

```

Query 1 ATGTTTCAAGACACTGAGGAAAAACCACGAACATTGCATGATTTGTGCCAAGCATTGGAG 60
Sbjct 46 ATGTTTCAAGACACTGAGGAAAAACCACGAACATTGCATGATTTGTGCCAAGCATTGGAG 105
Query 61 ACAACTATACACAACATTGAACTACAGTGCCTGGAATGCAAAAAACCTTTGCAACGATCT 120
Sbjct 106 ACAACTATACACAACATTGAACTACAGTGCCTGGAATGCAAAAAACCTTTGCAACGATCT 165
Query 121 GAGGTATATGATTTTGCATTTGCAGATTTAACAGTTGTATATAGAGAGGGAAATCCATTT 180
Sbjct 166 GAGGTATATGATTTTGCATTTGCAGATTTAACAGTTGTATATAGAGAGGGAAATCCATTT 225
Query 181 GGAATATGTAAACTGTGTTTGCAGTCTTATCTAAAATTAGTGAATATAGACATTATAAT 240
Sbjct 226 GGAATATGTAAACTGTGTTTGCAGTCTTATCTAAAATTAGTGAATATAGACATTATAAT 285
Query 241 TATTCTGTATATGAAATACATTAGAACAACAGTTAAAAAACCTTTAAATGAAATATTA 300
Sbjct 286 TATTCTGTATATGAAATACATTAGAACAACAGTTAAAAAACCTTTAAATGAAATATTA 345
Query 301 ATTAGGTGTATTATATGTCAAAGACCTTTGTGTCCTCAAGaaaaaaaaCGACATGTGGAT 360
Sbjct 346 ATTAGGTGTATTATATGTCAAAGACCTTTGTGTCCTCAAGAAAAAAAAACGACATGTGGAT 405
Query 361 TTAACAAACGATTTTCATAATATTTGGGTCGTTGGGCAGGGCGCTGTGCGGCGTGTGG 420
Sbjct 406 TTAACAAACGATTTTCATAATATTTGGGTCGTTGGGCAGGGCGCTGTGCGGCGTGTGG 465
Query 421 AGGTCCCGACGTAGAGAAACTGCACTGTGA 450
Sbjct 466 AGGTCCCGACGTAGAGAAACTGCACTGTGA 495

```

**Fig. 14. Alineación de la secuencia de la región E6 de VPH 33 con la de pHPV33 (514 pb)**

La secuencia del ORF de VPH 33 (GenBank M12732.1) fue alineada con la de pHPV33 (514 pb). 100% de identidad, Query cover 100%.



seleccionar la secuencia blanco tipo-específica para cada sonda, así como la secuencia lineal continua yuxtapuesta del brazo de extensión y anclaje de la sonda complementaria a la secuencia blanco de cada tipo de VPH de referencia (Fig. 15).

Decidimos que la longitud del elemento espaciador fuese diferente y característica de cada sonda, para que los monómeros tipo-específicos --con un sitio palindrómico único de corte (GGATCC) para *Bam* HI-- generados por restricción pudiesen distinguirse por su tamaño característico en geles de agarosa.

La secuencia global de cada sonda prevendría la formación de heterodímeros, homodímeros y estructuras secundarias que pudiesen interferir con la hibridación de la secuencia blanco a la secuencia lineal continua yuxtapuesta de los brazos de extensión y anclaje.

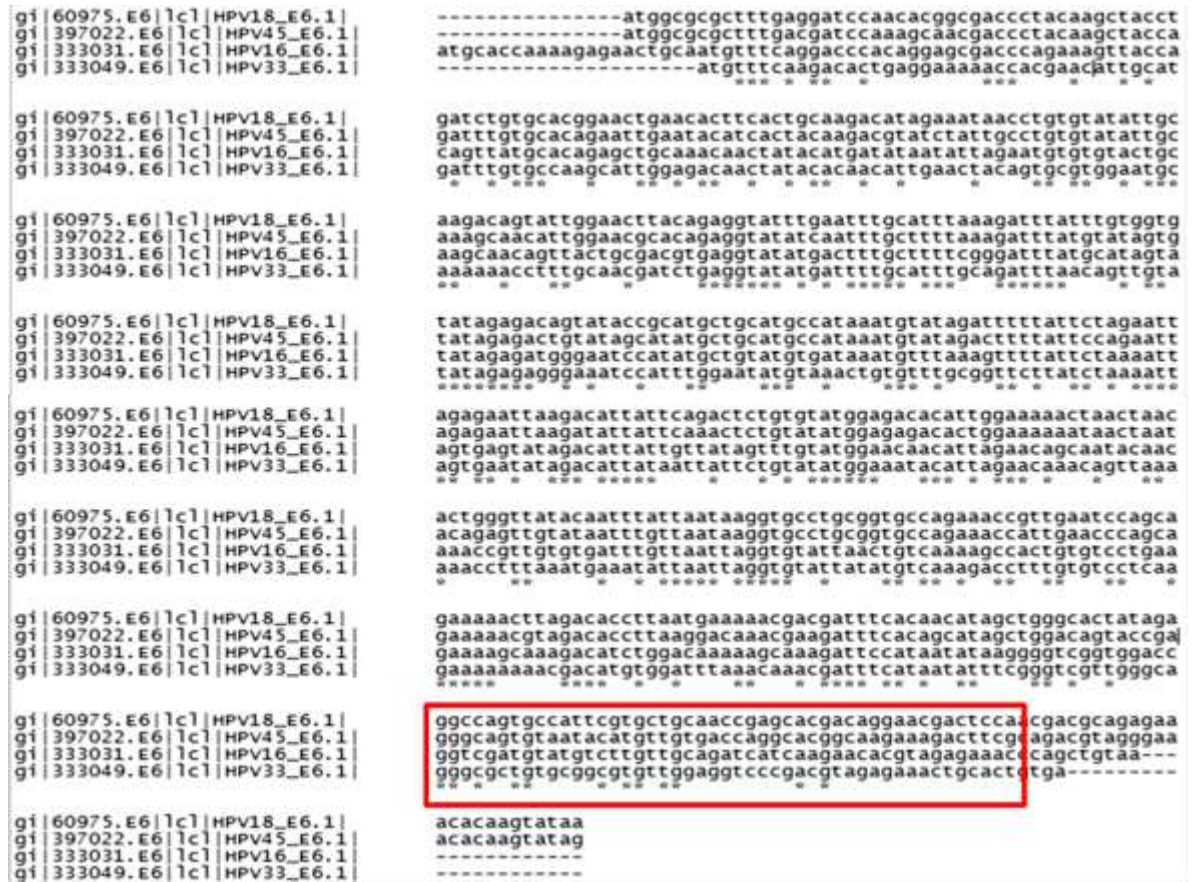
Las sondas padlock diseñadas para los cuatro tipos de VPH contendrían un sitio único de corte para *Bam* HI en el centro de cada elemento espaciador y su longitud total crecería con aumentos sucesivos de unos 20 nucleótidos: 1) SP-VPH16, 96 nt; 2) SP-VPH18, 114 nt; 3) SP-VPH33, 132 nt; 4) SP-VPH45, 153 nt (Tablas 7 y 8).

### ***Validación in silico de las sondas***

La validación *in silico* fue realizada en primer lugar para excluir la formación de heterodímeros, homodímeros y estructuras secundarias perjudiciales para el ensayo de las sondas e identificar los sitios de corte con *Bam* HI para obtener los monómeros esperados a partir de los concatémeros generados por las cuatro sondas en los ensayos SP-RCA.

En segundo lugar, para verificar la alineación de las secuencias de los tipos virales de referencia (en GenBank y PaVE) con las secuencias continuas de los brazos de extensión y anclaje yuxtapuestos de las cuatro sondas, para garantizar que las sondas 1) fuesen idénticas o casi idénticas a las de los ORF E6/E7 de los insertos, 2) hibridaran con las regiones para las cuales fueron diseñadas, y 3) fuesen idénticas o casi idénticas a las de las variantes de los cuatro tipos de VPH de interés.

Para asegurar la alineación de las sondas con las secuencias blanco de los ORF E6 de los plásmidos correspondientes y alinearlas con las secuencias de las variantes descritas para los cuatro tipos de VPH de interés, la validación se hizo con



**Fig. 15. Alineación de los ORF E6 de VPH 16, 18, 33 y 45**

Alineación con CLUSTAL O (1.2.1) multiple sequence alignment. A la izquierda el nombre del ORF y el tipo de VPH. El cuadro en rojo muestra las secuencias elegidas para el diseño de las sondas tipo-específicas. Los asteriscos indican los nucleótidos conservados.

**Tabla 7. Longitud (número de nucleótidos) de los elementos en las sondas padlock**

Sonda	Brazos			Elemento espaciador	Total
	Extensión	Anclaje	Ambos		
SP-VPH16	21	23	44	52	96
SP-VPH18	25	19	44	70	114
SP-VPH33	20	22	42	90	132
SP-VPH45	19	24	43	110	153

cuatro herramientas bioinformáticas: 1) mfold, para simular las estructuras secundarias; 2) idtdna, para predecir la formación de heterodímeros y homodímeros; 3) NEBcutter, para simular el corte con *Bam* HI de las sondas y los genomas virales de los cuatro tipos de interés; y 4) Blastn, para alinear tanto los brazos de anclaje y extensión yuxtapuestos como las secuencia espaciadoras de cada sonda con las secuencias (de GenBank y PaVe) y analizar los hits obtenidos.

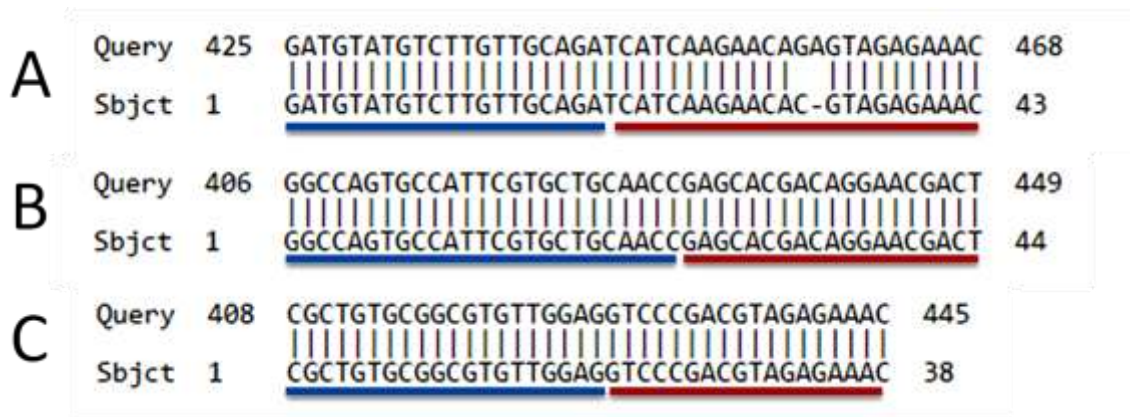
La formación de homodímeros y heterodímeros no representa un problema en los ensayos de RCA (Figs. 16 y 17). A 65 °C no hubo estructuras secundarias en los extremos de las sondas que impidiesen su hibridación con las secuencias blanco (Fig. 18).

Las secuencias lineales yuxtapuestas de las sondas correspondientes (Fig. 19) son complementarias e hibridarían con las secuencias de los ORF E6. SP-VPH16 hibridaría completamente mediante su brazo de extensión pero no el de anclaje (nucleótido 32 de la sonda; nucleótidos 456 y 457 del plásmido).

La simulación del corte con *Bam* HI en las sondas coincide con el diseño original, y en el genoma viral los cortes por *Bam* HI no parecen afectar la región de hibridación (Tabla 8). El análisis con Blastn para los brazos yuxtapuestos y los espaciadores dio los hits correspondientes con las secuencias de cada tipo de VPH y ningún hit con los espaciadores (Tabla 9).

La alineación de las secuencias yuxtapuestas de las sondas con los ORF E6 de los sublinajes (variantes) de cada tipo viral tuvo identidades del 95% al 100% (Tabla 10), lo cual sugiere que las sondas podrían utilizarse para los siguientes sublinajes de cada tipo: 1) tipo VPH 16: A1, A2, A3, A4; B1, B2; C1 y D1 (Europeo, Asiático, Africano); 2) tipo VPH 18: A1, A2, A3, A4; A5; B1, B2, B3 y C1 (Europeo, Asiático, Africano y Americano); 3) tipo VPH 33; A1, A2, A3 y B1 (ID HQ537688 hasta HQ537701); y 4) tipo VPH 45: A1, A2, A3, B1 y B2.

El análisis *in silico* por lo tanto indicó que las cuatro sondas no forman estructuras secundarias, ni heterodímeros u homodímeros que interfieran en los ensayos de RCA, y que el sitio único de corte para *Bam* HI localizado en el centro de las regiones espaciadoras es adecuado para restringir los concatémeros.



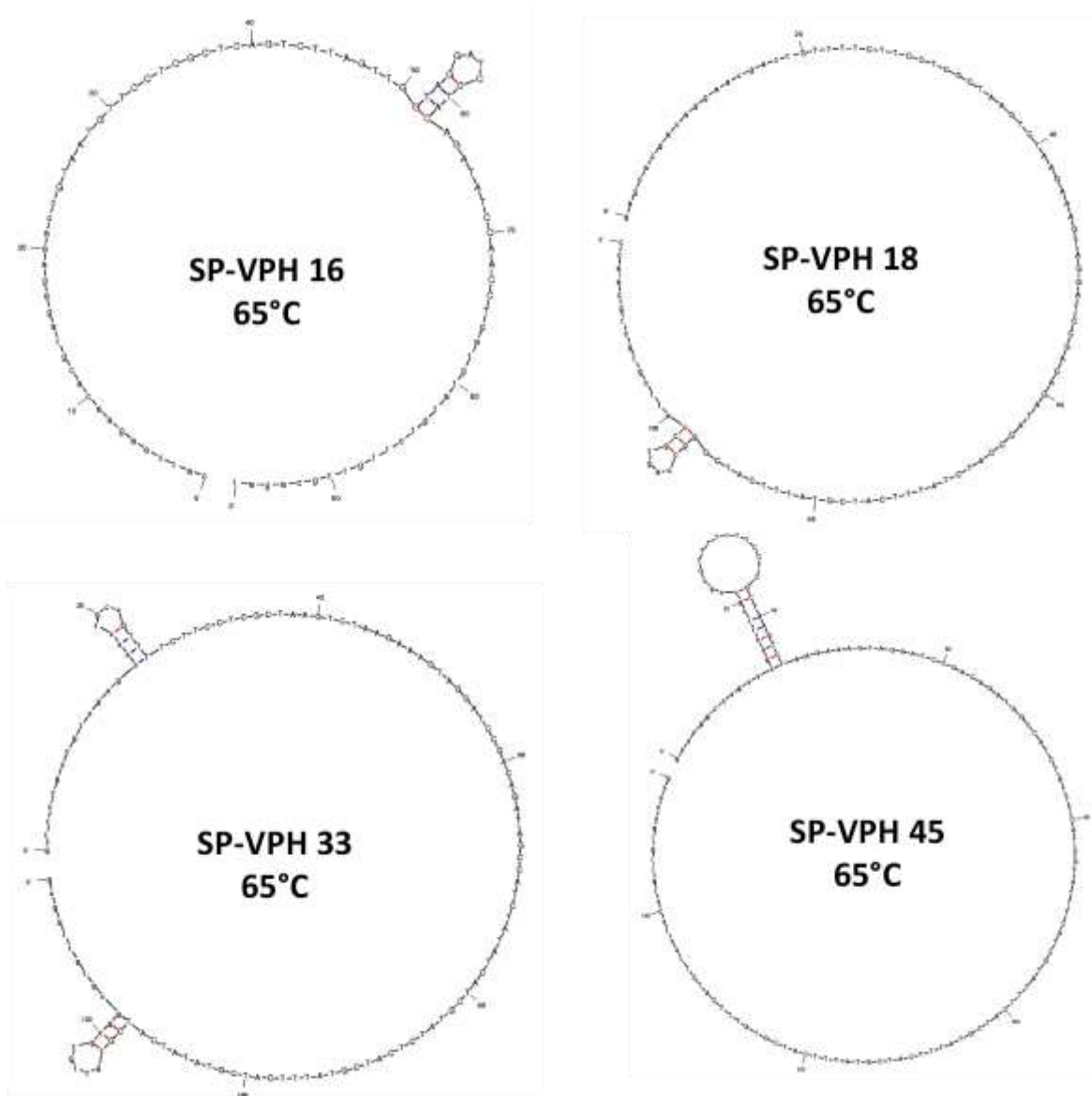
**Fig. 16. Alineación de las secuencias blanco de los ORF E6 de pHPV16, pHPV18 y pHPV33 con las secuencias de hibridación de las sondas respectivas**

(A) Secuencia blanco de pHPV16 alineada con la secuencia de hibridación de la sonda SP-VPH 16 (43 nt). (B) Secuencia blanco de pHPV18 alineada con la secuencia de hibridación de SP-VPH18 (44 nt). (C) Secuencia blanco de pHPV33 alineada con la secuencia de hibridación de SP-VPH33 (38 nt). Las líneas azules indican los brazos de extensión de las sondas; las líneas rojas los brazos de anclaje.



**Fig. 17. Homodímeros de las sondas padlock para VPH 16, 18, 33 y 45**  
Homodímeros representativos de las sondas SP-VPH16, SP-VPH18, SP-VPH33 y SP-VPH45 determinados *in silico* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>).





**Fig. 19. Estructuras secundarias de las sondas padlock a 65 °C**  
 Estructuras de SP-VPH16, SP-VPH18, SP-VPH33 y SP-VPH45 a 65 °C determinadas *in silico* (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/ADN-Folding-Form>).

**Tabla 8. Secuencias de las sondas padlock**

Sonda	Secuencia (5'→3')
SP-VPH16 96 nt	CATCAAGAACACGTAGAGAAACCGTAATGTTCTCGCTCAGTCTTAGTTGGT A <b>GGATCC</b> TACAGATATCCAACCTGATGTATGTCTTGTTGCAGAT
SP-VPH18 114 nt	GAGCACGACAGGAACGACTGTTTTCTTCCTCGCTAAGTCTAAGAAAGTA <b>GGA</b> <b>TCC</b> GACAGATAGCCATCTATTTTCATCGTATTTTCATCGGGCCAGTGCCATTTCG TGCTGCAACC
SP-VPH33 132 nt	GTCCCGACGTAGAGAAACTGCAGTTTTCTTCCTCGCTAAGTCTAAGAAAGTA <b>GGATCC</b> GACAGATAGCCATCTATATCATCGTATCTCATCGTATTTTCATCGTA TATCATCGCGCTGTGCGGCGTGTGGAG
SP-VPH45 153 nt	GCACGGCAAGAAAGACTTCGCAGAGTTTTCTTCCTCGCTAAGTCTAAGAAAG TA <b>GGATCC</b> GACAGATAGCCATCTATTTTCATCGTATTTTCATCGTATTTTCATCG TATTTTCATCGTATTTTCATCGTATTTTCATCTTAATACATGTTGTGACCAG

Resaltadas en gris, secuencias de los brazos de extensión (extremo 5') y de anclaje (extremo 3'). Negritas resaltadas en azul, secuencias para el corte con Bam HI.

**Tabla 9. Hibridación de las sondas a los ORF E6 respectivos (hits con Blastn)**

Sonda	Secuencia	
	Brazos yuxtapuestos	Espaciador
SP-VPH16	100 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
SP-VPH18	100 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
SP-VPH33	84 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
SP-VPH45	100 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>

<sup>a</sup> Hits con VPH 16.

<sup>b</sup> Hits con VPH 18.

<sup>c</sup> Hits con VPH 33.

<sup>d</sup> Hits con VPH 45.



**Tabla 10. Alineación de las secuencias anclaje-extensión yuxtapuestas de SP-VP16 a los ORF E6 de variantes de los tipos VPH 16, 18, 33 y 45**

Tipo	Linaje	Sublinaje	GenBank accesión	Nombre común <sup>a</sup>	Query cover	Identidad
VPH 16	LA	A1	<a href="#">K02718</a>	E	100%	100%
	LA	A2	<a href="#">AF536179</a>	SN	100%	100%
	LA	A3	<a href="#">HQ644236</a>	SN	100%	100%
	LA	A4	<a href="#">AF534061</a>	As; E	100%	100%
	B	B1	<a href="#">AF536180</a>	Af1; Afr1a	100%	100%
	B	B2	<a href="#">HQ644298</a>	SN	100%	100%
	C	C1	<a href="#">AF472509</a>	Af2; Afr2a	100%	100%
	D	D1	<a href="#">HQ644257</a>	NA1	100%	100%
	D	D2	<a href="#">AY686579</a>	AA2	100%	98%
	D3	<a href="#">AF402678</a>	AA1	100%	98%	
VPH 18	A	A1	<a href="#">AY262282</a>	AsAi; AA; E1	100%	100%
	A	A2	<a href="#">EF202146</a>	SN	100%	98%
	A	A3	<a href="#">EF202147</a>	E; E 2	100%	98%
	A	A4	<a href="#">EF202151</a>	SN	100%	98%
	A	A5	<a href="#">GQ180787</a>	E	100%	98%
	B	B1	<a href="#">EF202155</a>	Af, Af1	90%	100%
	B	B2	<a href="#">KC470225</a>	Af	90%	100%
	B	B3	<a href="#">EF202152</a>	Af, Af2	90%	100%
	C	C1	<a href="#">KC470229</a>	Af	90%	100%
VPH 33	A	A1	<a href="#">M12732</a>	A	100%	100%
	A	A2	<a href="#">HQ537698</a>	B	100%	100%
	A	A3	<a href="#">EU918766</a>	SN	100%	100%
	B	B1	<a href="#">HQ537688</a> <a href="#">HQ537701</a>	SN	100%	100%
	B	B1	<a href="#">HQ537702</a> <a href="#">HQ537707</a>	C	100%	95%
VPH 45	A	A1	<a href="#">X74479</a>	SN	100%	100%
	A	A2	<a href="#">EF202157</a>	SN	100%	100%
	A	A3	<a href="#">KC470256</a>	SN	100%	100%
	B	B1	<a href="#">EF202161</a>	SN	100%	100%
	B	B2	<a href="#">EF202164</a>	SN	100%	100%

<sup>a</sup> E, European. As, Asian. Af1, African 1. Af2, African 2. NA, North American 1. AA, Asian American. AsAi, AA (A1/A2). SN, sin nombre.

Fuente: [http://pave.niaid.nih.gov/#explore/variants/variant\\_genomes](http://pave.niaid.nih.gov/#explore/variants/variant_genomes),  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>



Los hits para las secuencias lineales continuas de los brazos de extensión y anclaje yuxtapuestos de las cuatro sondas corresponden a los tipos de VPH esperados, que incluyen un total de 38 variantes.

## **Ensayo preliminar de la sonda SP-VPH16**

Para ver si las mezclas con la secuencia blanco de SP-VPH16 generan los monómeros de 96 pb por restricción de los concatémeros con *Bam* HI, probamos mezclas de RCA con SP-HPV16 y tres modalidades de la secuencia blanco: 1) amplicón E6-457 pb; 2) pHPV16 intacto; y 3) pHPV16 linearizado por restricción con *Bam* HI.

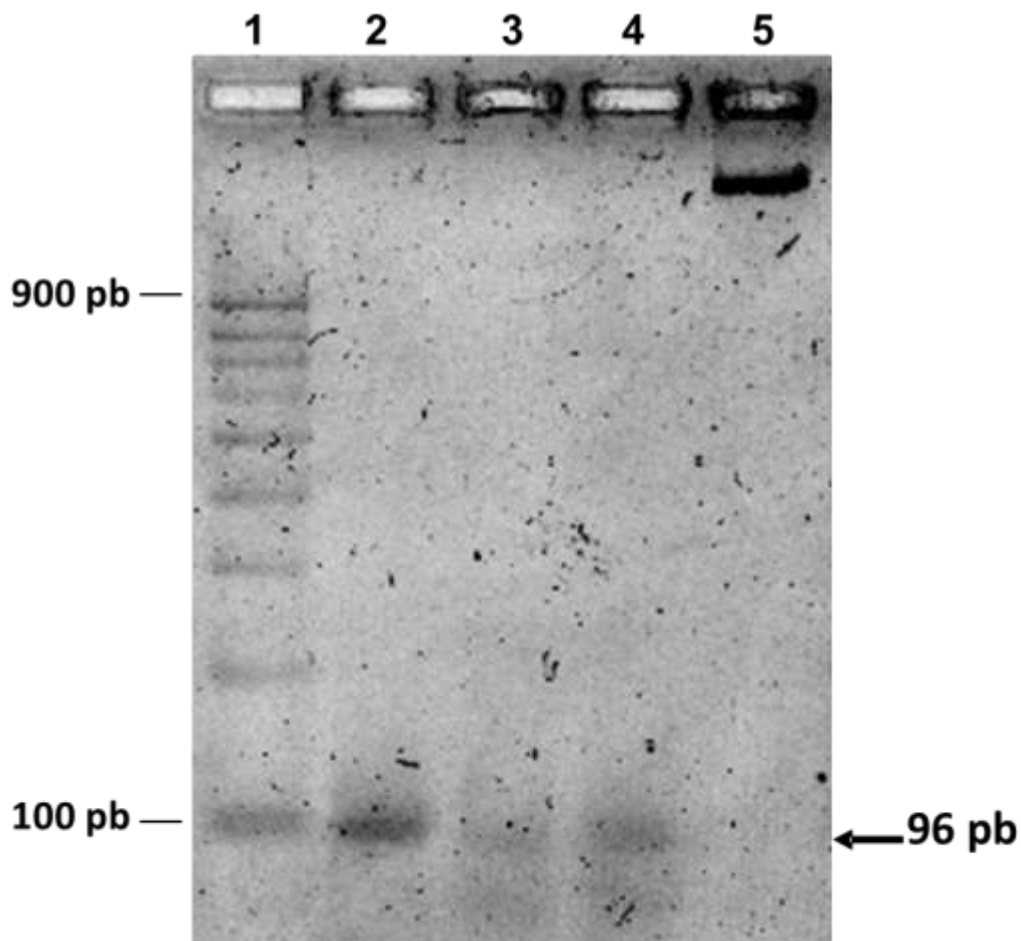
Después de la desnaturalización térmica incubamos las mezclas en condiciones apropiadas para la hibridación de la sonda con la secuencia blanco; luego circularizamos la sonda hibridada con ligasa T4; enseguida incubamos la mezcla para la amplificación isotérmica preparada con el kit TempliPhi 100 para generar concatémeros lineales en tándem a partir de la sonda circularizada; restringimos las mezclas amplificadas con *Bam* HI y finalmente las sometimos a electroforesis en geles de agarosa para estimar su tamaño.

Detectamos la banda única de 96 pb esperada después de la restricción con *Bam* HI en las mezclas de RCA con SP-VPH16 y las tres formas de la secuencia blanco (amplicón E6-16 457 pb, pHPV16 intacto, o pHPV16 restringido con *Bam* HI) (Tabla 11, Fig. 20). Por delante de la banda esperada observamos una mancha tenue difusa (< 90 pb), correspondiente al frente de la electroforesis.

Concluimos que las condiciones de las mezclas para RCA con SP-VPH16 y la secuencia blanco (i.e., ORF E6/E7 de VPH 16) en sus tres modalidades son idóneas para 1) la hibridación de SP-VPH16 al ORF E6, 2) la ligación de SP-VPH16, 3) la generación de concatémeros en la mezcla de RCA estándar, y 4) la obtención de los monómeros de 96 pb esperados por restricción con *Bam* HI. Concluimos también que la preamplificación del ORF E6 y la linearización del plásmido son innecesarias.

**Tabla 11. Ensayo SP-RCA preliminar de SP-VPH16 con TempliPhi 100**

Fuente de ADN	Bandas (pb)	
	Esperadas	Obtenidas
Amplicón E6-VPH16	96 pb	96 pb, <90 pb
pHPV16 intacto	96 pb	96 pb, <90 pb
pHPV16 lineal	96 pb	96 pb, <90 pb



**Fig. 20. Las mezclas de RCA para SP-VPH16 generan el monómero esperado (96 pb) a partir del amplicón E6 457 generado por PCR-MA o a partir de pHPV16 intacto o linearizado**

Gel SB-agarosa al 1.5% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h. Carril 1, escalera 100 pb. Carril 2, RCA a partir de mezcla de PCR-MA para E6 457 pb. Carril 3, RCA a partir de pHPV16 intacto. Carril 4, RCA a partir de pHPV16 linearizado. Carril 5, control positivo (pUC19).

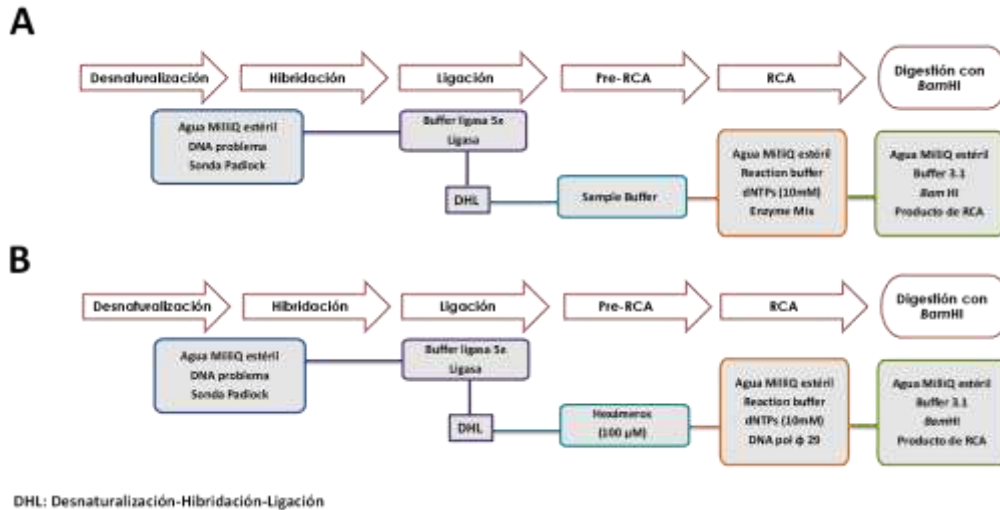
## Ensayos SP-RCA con TempliPhi 100 o Pol Φ29 y variaciones en el contenido de sonda y tiempo de incubación

Hicimos estos ensayos para comparar la amplificación y la cantidad mínima de sonda amplificable en mezclas de RCA con el kit de amplificación TempliPhi 100 o con Pol Φ29.

Para comparar la amplificación, el ADN blanco fue desnaturalizado, las sondas SP-VPH18 y SP-VPH33 fueron hibridadas en ensayos por separado y la ligasa unió los extremos de las sondas para circularizarlas. La RCA se llevó a cabo en mezclas con TempliPhi 100 (Fig. 21A) o Pol Φ29 (Fig. 21B) incubadas 18 h (tiempo estándar inicial) para generar concatémeros (ADN de cadena doble) a partir de las sondas circularizadas. *Bam* HI cortó luego los concatémeros para obtener monómeros que fueron separados por electroforesis en geles de agarosa.

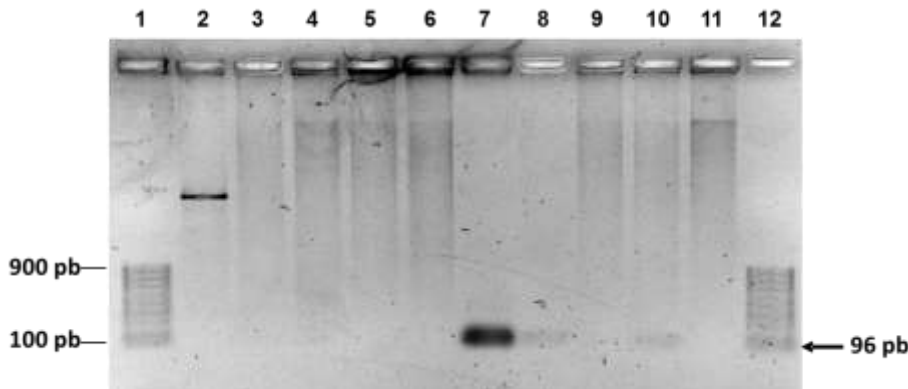
Para determinar la cantidad mínima de sonda amplificable, con ADN blanco desnaturalizado fueron preparadas mezclas de RCA con pHPV16, TempliPhi 100 y diluciones logarítmicas seriadas de SP-VPH16 ( $10^7$ - $10^{11}$  moléculas); las mezclas fueron incubadas 4 h y los concatémeros restringidos con *Bam* HI (Fig. 22).

En las mezclas con TempliPhi100 obtuvimos las bandas únicas esperadas con SP-VPH18 (Fig. 23) y SP-VPH33 (Fig. 24). En las mezclas con Pol Φ29 obtuvimos las bandas únicas esperadas con SP-VPH16, SP-VPH18 y SP-VPH33 (Fig. 25). En ensayos con  $10^7$ - $10^{11}$  moléculas de sonda, la banda única esperada con SP-VPH16 fue más intensa con  $10^{11}$  moléculas (Fig. 22). Las bandas únicas esperadas para cada sonda tuvieron intensidad similar con incubación por 4 h (Fig. 23) o 18 h (Figs. 23-25). La nitidez de los monómeros fue máxima con 15  $\mu$ L de mezclas restringidas con 1 U/ $\mu$ L de *Bam* HI (Fig. 25).



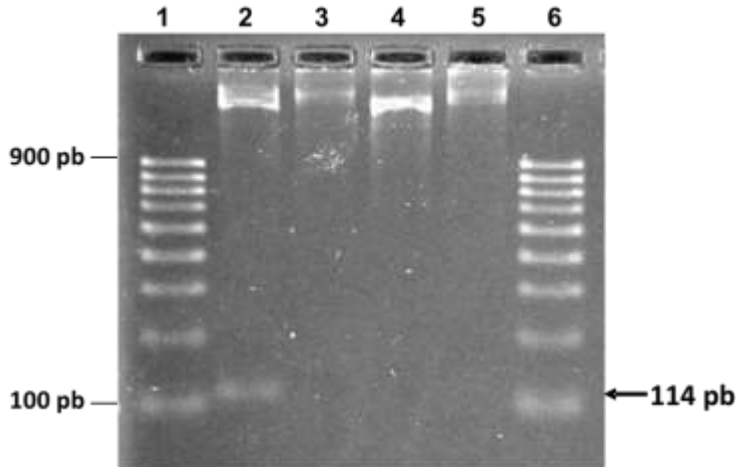
### Fig. 21. Ensayos SP-RCA con TempliPhi 100 o Pol Φ29

(A) Ensayos SP-RCA con el kit TempliPhi 100. Etapas sucesivas: desnaturalización térmica del ADN, hibridación de la sonda, ligación de la sonda, adición del buffer (pre-RCA), RCA, y restricción de los concatémeros. (B) Ensayos SP-RCA con Pol Φ29. Etapas sucesivas: desnaturalización térmica del ADN, hibridación de la sonda, ligación de la sonda, adición de hexámeros aleatorios (pre-RCA), RCA y restricción de los concatémeros.



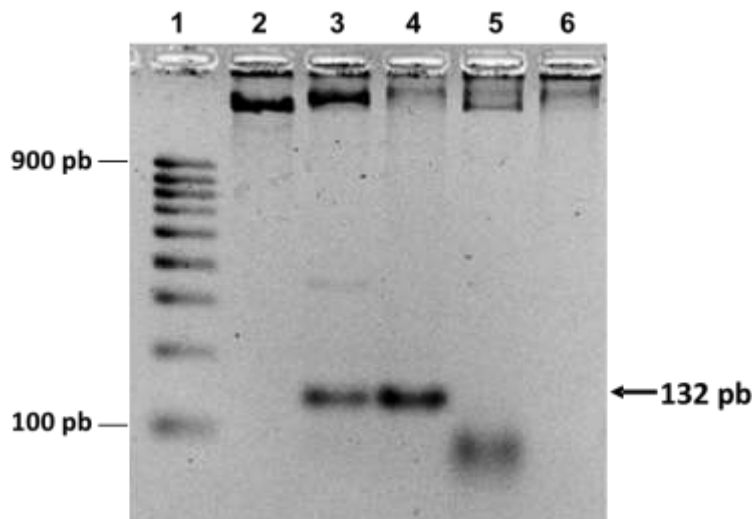
### Fig. 22. Las mezclas de RCA para SP-VPH16 generan el monómero esperado (96 pb) con pHPV16 más intenso con $10^{11}$ moléculas de sonda

Gel SB-agarosa al 1% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 4 h. Carriles 1 y 12, escalera 100 pb. Carril 2, control positivo (pUC19). Carriles 3-6, RCA control negativo (sin ADN) con diluciones logarítmicas seriadas de SP-HPV16 ( $10^{11}$  a  $10^7$  moléculas): Carriles 7-10, RCA con pHPV16 y diluciones logarítmicas seriadas de SP-HPV16 ( $10^{11}$  a  $10^7$  moléculas) con la banda de 96 pb correspondiente al monómero esperado. Carril 11, control negativo (mezcla sin sonda).



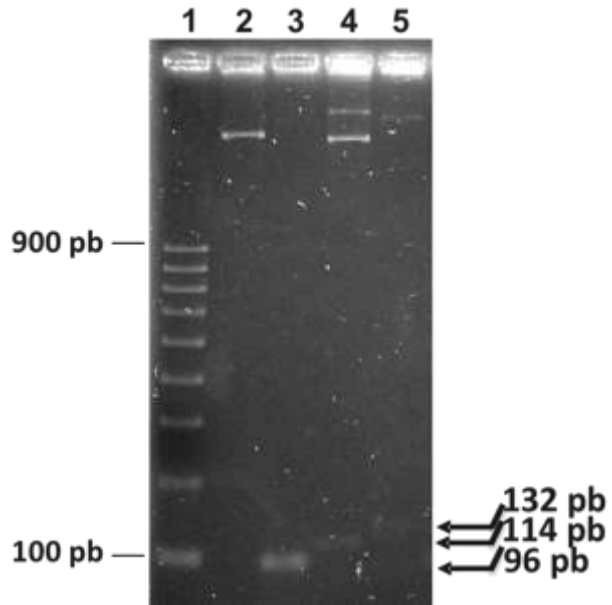
**Fig. 23. La mezcla de RCA para SP-VPH18 genera el monómero esperado (114 pb) a partir de pHPV18**

Gel SB-agarosa al 1.5% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h. Carriles 1 y 6, escalera 100 pb. Carril 2, RCA con pHPV18, con banda de 114 pb correspondiente al monómero esperado. Carril 3, Mezcla con sonda padlock ( $10^9$  moléculas) sin ADN. Carril 4, control positivo (pUC19). Carril 5, control negativo (sin sonda).



**Fig. 24. Las mezclas de RCA para SP-VPH33 generan el monómero esperado (132 pb) a partir de pHPV33**

Gel SB-agarosa al 1.5% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h. Carril 1, escalera 100 pb. Carril 2, control positivo (pUC19). Carriles 3 y 4, RCA con pHPV33, banda de 132 pb correspondiente al monómero esperado a partir del plásmido digerido e intacto, respectivamente. Carril 5, Mezcla con sonda padlock ( $10^9$  moléculas) sin ADN. Carril 6, control negativo (sin sonda).



**Fig. 25. Los monómeros de cada sonda tienen las migraciones esperadas en ensayos SP-RCA con Pol  $\Phi$ 29**

Gel SB-agarosa al 1.5% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h. Carril 1, escalera 100 pb. Carril 2, control positivo (pUC19). Carril 3, RCA con pHPV16, con la banda de 96 pb esperada. Carril 4, RCA con pHPV18, con la banda de 114 pb esperada. Carril 5, RCA con pHPV33, con la banda de 132 pb esperada.

Concluimos que: 1) los ensayos de RCA para SP-VPH16, SP-VPH18 y SP-VPH33 pueden hacerse con TempliPhi 100 o Pol  $\Phi$ 29 (Tabla 12), 2) la intensidad de los monómeros depende de la concentración de la sonda y es mayor con  $10^{11}$  moléculas por mezcla, 3) la nitidez e intensidad de la banda de monómeros en geles de agarosa es mayor con 15  $\mu$ L de mezclas restringidas con 1 U/ $\mu$ L de *Bam* HI y 4) la amplificación es similar con 4 o 18 h de incubación.

### **SP-RCA de un raspado cervical con VPH 16**

Para validar la detección de VPH 16 en un raspado cervical con infección única por VPH 16 llevamos a cabo el ensayo SP-RCA con Pol  $\Phi$ 29 y ADN del raspado DVR, diagnosticado previamente con infección única por VPH 16 (Tabla 12).

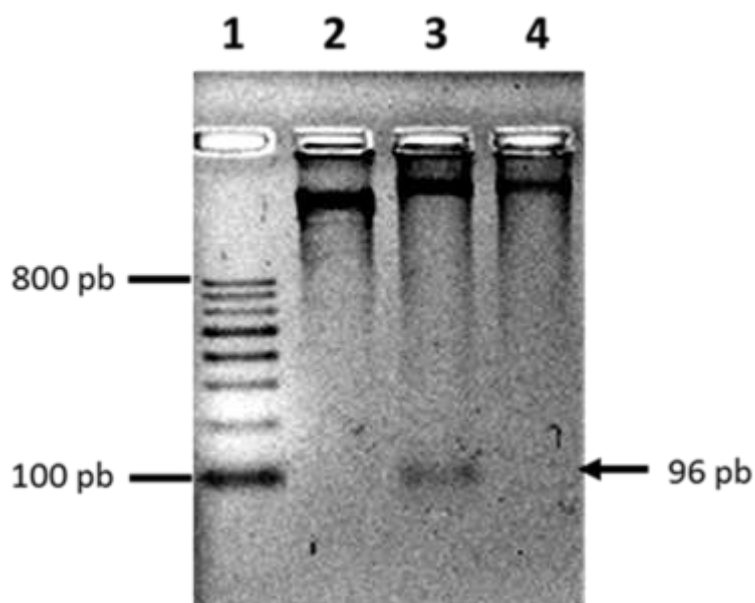
Obtuvimos la banda única esperada de 96 pb en mezclas incubadas 18 h con la sonda SP-VPH16 (Fig. 26).

Concluimos que el raspado cervical con infección única por VPH 16 es amplificable en el ensayo SP-RCA incubado 2.5 h (datos no mostrados) y la restricción de los concatémicos genera la banda única de 96 pb del monómero esperado con la sonda SP-VPH16.

**Tabla 12. Ensayos SP-RCA de SP-VPH16, SP-VPH18 y SP-VPH33 con TempliPhi 100 y Pol  $\Phi$ 29**

ADN blanco	Bandas (pb)		
	Esperadas	TempliPhi	Pol $\Phi$ 29
pHPV16	96 pb	96 pb, <90 pb	96 pb
DVR (VPH 16)	96 pb	ND	96 pb
pHPV18	114 pb	114 pb	114 pb
pHPV33	132 pb	132 pb	132 pb

ND, no determinada.



**Fig. 26. El ensayo SP-RCA con ADN del raspado cervical 60 (infección única por VPH 16) genera el monómero esperado (96 pb)**

Gel SB-agarosa al 2.0% de 0.5 cm de espesor. Mezclas de RCA incubadas 18 h. Carril 1, escalera 100 pb. Carril 2, control positivo (pUC19). Carril 3, RCA con la muestra, con una banda de 96 pb correspondiente a los monómeros de la SP-VPH16. Carril 4, control negativo.



## Discusión

Los ensayos SP-RCA uniplex desarrollados en este trabajo disminuyen el costo y requieren personal mínimamente capacitado para la detección de los tipos de VPH 16, 18 y 33. Las sondas SP-VPH16, SP-VPH18 y SP-VPH33, diseñadas y validadas *in silico* detectaron los tipos de VPH esperados en ensayos SP-RCA con plásmidos que contienen genomas completos de VPH 16, 18 y 33. Por otra parte, con sólo 2.5 h de amplificación, la sonda SP-VPH16 detectó la infección por VPH 16 diagnosticada previamente en un raspado cervical.

La detección de 33 variantes de VPH 16, 18 y 33 validada *in silico* para las tres sondas sugiere que el espectro de detección de los tipos de VPH en ensayos SP-RCA es muy amplio, un aspecto no considerado por otros autores (Akhras et al. 2007; Lin et al. 2013; Yan et al. 2014).

El diseño de las sondas para VPH 16, 18 y 33 fue dirigido a la región E6 y no a la región L1, porque las infecciones persistentes que progresan al cáncer invasor requieren expresión continua del oncogén E6 y pueden dar lugar a diagnósticos falsos negativos cuando en las células tumorales se ha integrado el genoma viral con delección de la región L1 (Tjalma and Depuydt 2013).

La ligación de las sondas hibridadas por 2 h a 25 °C disminuye el tiempo que en otros ensayos toma 4 h (Lin et al. 2013). La amplificación de las sondas en los ensayos SP-RCA puede llevarse a cabo en condiciones isotérmicas tanto en mezclas con el kit TempliPhi 100 como en mezclas de composición definida suplementadas con Pol  $\Phi$ 29 y hexámeros aleatorios.

La detección electroforética de los monómeros esperados de 96, 114 y 132 pb en geles de agarosa puede hacerse después de la digestión de los concatémeros con Bam HI.

La duración de 22.5 h de los ensayos SP-RCA para VPH (Rodríguez-Ortiz 2013) fue reducida a 6-8.5 h en este trabajo. La intensidad de los monómeros fue similar con incubaciones de 4 y 18 h para la RCA.

Otros ensayos de RCA para VPH emplean sondas más complejas que unen un oligonucleótido y son amplificadas por 19 h (Yan et al. 2014). Akhras et al. (2007)

los desarrollaron con ciclos de desnaturalización, hibridación-ligación y hasta 60 ciclos con un incremento en la temperatura de annealing para enriquecer el blanco.

La mezcla del ensayo SP-RCA para el raspado cervical con VPH 16 contenía solamente 37.8 ng de ADN, en tanto que Akhras et al. (2007) utilizaron 200 ng de ADN.

El corte de los concatémeros con 1 U/ $\mu$ L de *Bam* HI en mezclas de 15  $\mu$ L dio mayor nitidez a los monómeros separados electroforéticamente que la cantidad sugerida por el fabricante para mezclas de 50  $\mu$ L.

Una limitación de nuestros ensayos es que antes de la RCA deben ser ejecutados tres pasos consecutivos: 1) desnaturalización del ADN blanco, 2) hibridación y 3) ligación de la sonda. Otros autores lo consiguen en un solo paso sometiendo las mezclas a digestión con un coctel de endonucleasas sin calentamiento ni enfriamiento (Yan et al. 2014), que puede ser seguido por PCR . (Akhras et al. 2007). Realizarlos en un solo paso es una meta para perfeccionar los ensayos SP-RCA.

Hasta ahora hemos montado ensayos uniplex con cada sonda padlock para asegurar la especificidad en la detección de los tipos de VPH correspondientes. La siguiente etapa es montar ensayo multiplex que seguramente funcionarán, como ya lo demostraron Akhras et al. (2007). Después seguiría intentar hacerlos en un solo paso.

## Referencias

- Akhras MS, Thiyagarajan S, Villablanca AC, Davis RW, Nyren P, Pourmand N (2007) PathogenMip assay: a multiplex pathogen detection assay. *PLoS One* 2:e223
- Baner J, Nilsson M, Mendel-Hartvig M, Landegren U (1998) Signal amplification of padlock probes by rolling circle replication. *Nucleic acids research* 26:5073-8
- Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic acids research* 7:1513-23
- Bruni L, Diaz M, Castellsague X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose S (2010) Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *The Journal of infectious diseases* 202:1789-99
- Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Munoz N, Franceschi S (2003) Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British journal of cancer* 88:63-73
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27
- DelaRosa-Martinez R, Sanchez-Garza M, Lopez-Revilla R (2016) HPV genotype distribution and anomalous association of HPV33 to cervical neoplastic lesions in San Luis Potosi, Mexico. *Infectious agents and cancer* 11:16
- Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* 30 Suppl 5:F55-70
- Halec G, Alemany L, Lloveras B, Schmitt M, Alejo M, Bosch FX, Tous S, Klaustermeier JE, Guimera N, Grabe N, Lahrmann B, Gissmann L, Quint W, de Sanjose S, Pawlita M (2014) Pathogenic role of the eight probably/possibly carcinogenic HPV types 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 and 82 in cervical cancer. *The Journal of pathology* 234:441-51
- INC (2015) HPV and Cancer. El Instituto Nacional de Cáncer
- Lin C, Zhang Y, Zhou X, Yao B, Fang Q (2013) Naked-eye detection of nucleic acids through rolling circle amplification and magnetic particle mediated aggregation. *Biosensors & bioelectronics* 47:515-9
- Lopez-Revilla R, Martinez-Contreras LA, Sanchez-Garza M (2008) Prevalence of high-risk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infectious agents and cancer* 3:3
- Magaña-León C (2017) Tipos de virus del papiloma humano en cánceres del cérvix, la región anogenital y la cavidad oral en el estado de San Luis Potosí, México. División de Biología Molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM (1989) Use of Polymerase Chain-Reaction Amplification for the Detection of Genital Human Papillomaviruses. *Molecular Diagnostics of Human Cancer* 7:209-214
- 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. *The New England journal of medicine* 357:1579-88
- Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L (2006) Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3:S3/1-10
- Nilsson M, Malmgren H, Samiotaki M, Kwiatkowski M, Chowdhary BP, Landegren U (1994) Padlock probes: circularizing oligonucleotides for localized DNA detection. *Science* 265:2085-8
- 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. *Urological research* 26:165-9
- OMS (2016) Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. Organización Mundial de la Salud
- Rodríguez-Ortiz CA (2013) Virus del papiloma humano tipo 16 con una delección de 2.4 kilobases. División de Biología Molecular. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí
- Schellekens MC, Dijkman A, Aziz MF, Siregar B, Cornain S, Kolkman-Uljee S, Peters LA, Fleuren GJ (2004) Prevalence of single and multiple HPV types in cervical carcinomas in Jakarta, Indonesia. *Gynecologic oncology* 93:49-53
- Schmeink CE, Massuger LF, Lenselink CH, Quint WG, Witte BI, Berkhof J, Melchers WJ, Bekkers RL (2013) Prospective follow-up of 2,065 young unscreened women to study human papillomavirus incidence and clearance. *International journal of cancer. Journal international du cancer* 133:172-81
- Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM (2007) Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update. *International journal of cancer* 121:621-32
- Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bultmann B (2004) Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology* 42:3176-84
- Tjalma WA, Depuydt CE (2013) Cervical cancer screening: which HPV test should be used--L1 or E6/E7? *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* 170:45-6
- van Ham MA, Bakkers JM, Harbers GK, Quint WG, Massuger LF, Melchers WJ (2005) comparison of two commercial assays for detection of human papillomavirus (HPV) in cervical scrape specimens: validation of the Roche AMPLICOR HPV test as a means to screen for HPV genotypes associated with a higher risk of cervical disorders. *Journal of clinical microbiology* 43:2662-7
- van Hamont D, van Ham MA, Bakkers JM, Massuger LF, Melchers WJ (2006) Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *Journal of clinical microbiology* 44:3122-9
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary

cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 189:12-9

Yan L, Liu K, Sintim HO (2014) Convenient detection of HPV virus in a clinical sample using concurrent rolling circle and junction probe amplifications. *Chemical communications* 50:7147-9

zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochimica et biophysica acta* 1288:F55-78