



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



LABORATORIO DE BIOLOGIA Y MEDICINA EXPERIMENTAL

Detección y tipificación de VPH utilizando la técnica PCR –RFLP sobre el amplificado GP5/GP6 del gen L1 en geles de electroforesis de poliacrilamida sumergidos.

Trabajo especial de grado presentado por la **Br. Alba Rivas** como requisito para optar por el Título de **Licenciada en Biología**.

Tutor: Dr. Jhon Cruz

Mérida, Noviembre 2016

A DIOS y mis padres

Por y para uds...

www.bdigital.ula.ve

Agradecimientos

En honor de haber cumplido con mucha paciencia y perseverancia esta gran meta para mí, quiero agradecer muy especialmente a todos aquellos que estuvieron conmigo en el transcurso de esta etapa de vida.

A DIOS primeramente gracias por esta meta cumplida e inolvidable para mí.

A mis padres porque siempre fueron mi apoyo y ejemplo de constancia y superación, los amo.

A Duchi que no tengo palabras para describir lo maravillosa amiga que fuiste. Mil gracias porque sin ti tampoco estaría aquí, te quiero y te llevo en mi corazón por siempre.

A mi amiga Lea por tu apoyo incondicional en cada momento y porque tu fe en Dios ayudo a la mía. Te extrañare y querré por siempre.

A Daniel porque siempre que te necesite has estado allí escuchándome. Te quiero.

A mis hermanas del alma Jessika y Nathely, por estar ahí siempre para todo. Las súper Amo.

A mi amigui Yonara y su familia por todo su apoyo. Los Amo.

A María Eugenia por entenderme tanto en tantas cosas, gracias amiga bella te quiero mucho.

A mi gema Nadia porque cada consejo aprendido me ayudo a llegar hasta aquí, Gracias. T quiero mucho.

A mis tíos Suhel y Mary, por siempre apoyarme y ayudarme en todo y por cada consejo y momento compartido. Los quiero mucho.

A mi Susy porque siempre tu rayito de luz ilumina cada momento de mi vida. Te súper quiero.

A Karla por su: “vamos que tu puedes guerrera!” y por estar ahí siempre apoyándome en todo. Te súper quiero mucho.

A la Ilustre Universidad de Los Andes y la Facultad de Ciencias.

Al Laboratorio de Biología y Medicina Experimental LABIOMEX y todo el personal que allí labora.

Al Dr. Juan Puig y los profesores Jhon Cruz y Militza Quintero por sus consejos y apoyo en todo momento, principalmente por los conocimientos brindados durante la realización de este trabajo.

A la sra Sioly Márquez por toda su ayuda.

A la sra dorita por todo su cariño y apoyo. La quiero mucho.

A Juan y el flaco porque siempre es bueno compartir buenas ideas en momentos de espera en el lab.

A mis amigos de toda la vida y de la faculta: Daniel, Franklin, Nelin, Nadia Marchan, Yito, cote, Angélica, Luci, Delly, Aron, David, Camila los amo.

Resumen

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus de ADN de doble cadena, circular, que infecta el epitelio escamoso en individuos sanos para producir verrugas y condilomas. La gran variabilidad genética del VPH permite elegir una secuencia correspondiente a la región L1 del genoma, zona que permite identificar la mayoría de los sub tipos conocidos de este virus. Las técnicas de biología molecular como lo son el test de híbridos y PCR permiten identificar con una mayor sensibilidad los sub tipos de VPH existentes, en este caso la PCR-RFLP sobre la región amplificada GP5/GP6 tiene una mayor sensibilidad que es de difícil tipificación por otras técnicas convencionales. En este proyecto identifica y tipifica diferentes tipos de VPH mediante la técnica de PCR-RFLP utilizando un algoritmo creado en el laboratorio basado en el análisis RFLP que permite la mencionada tipificación de los VPH antes mencionados. Para ello se utiliza el gen L1 de 17 VPH distintos clonados en plásmidos de la colección de LABIOMEX, se amplifican secuencias específicas del ADN del VPH mediante PCR MY09/MY11 en nested con GP5/GP6 y luego electroforesis en geles de poliacrilamida 6% para una óptima visualización de fragmentos menores a 100pb.

Palabras clave: VPH, PCR-RFLP, GP5/GP6, MY09/MY11, L1, Poliacrilamida.

Abstract

The human papillomavirus (HPV) is a DNA virus double-stranded, circular, which infects the squamous epithelium to produce healthy individuals warts and genital warts. The high genetic variability of HPV can choose one corresponding to the L1 region of the genome sequence that identifies the area most known sub types of this virus. The molecular biology techniques such as test hybrids and PCR to identify with greater sensitivity sub HPV types existing in this case the PCR-RFLP on the amplified region GP5/GP6 has a higher sensitivity is difficult typing by other conventional techniques. This project identify and typify different types of HPV by PCR-RFLP technique using an algorithm based on RFLP analysis laboratory that allows typing of HPV above. For this, the L1 gene 17 HPV different cloned in plasmids collection LABIOMEX be used, specific sequences of HPV DNA will be amplified by PCR MY09 / MY11 and nested GP5 / GP6 and then electrophoresis on polyacrylamide gels 6% to visualize smaller fragments to 100bp.

Keywords: VPH, PCR-RFLP, GP5/GP6, MY09/MY11, L1, polyacrylamide.

Índice General

Página

| | |
|--|------|
| Resumen..... | v |
| Índice General..... | vi |
| Índice de Figuras..... | viii |
| Índice de Tablas..... | x |
| Abreviaciones..... | xi |
| Introducción..... | 1 |
| Caracterización general del virus de papiloma humano..... | 1 |
| Clasificación taxonómica de los tipos de VPH..... | 2 |
| Organización genómica del virus del papiloma humano..... | 3 |
| Ciclo viral..... | 6 |
| Virus de papiloma humano y cáncer..... | 7 |
| Técnicas moleculares utilizadas en la detección y tipificación del VPH..... | 8 |
| Antecedentes..... | 11 |
| Hipótesis..... | 12 |
| Objetivo general..... | 13 |
| Objetivos específicos..... | 13 |
| Justificación..... | 14 |
| Materiales y métodos..... | 15 |
| Material biológico..... | 15 |
| Cepillados del área genital..... | 15 |
| Purificación de ADN..... | 16 |
| Alineamiento de las secuencias del gen L1 DE VPH con los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5/GP6..... | 16 |
| Estandarización de la PCR MY09/ MY11 y PCR-Nested GP5/GP6..... | 17 |
| Estandarización de la RFLP de los amplificadores GP5/GP6..... | 19 |
| Estandarización de la electroforesis en geles de poliacrilamida para la visualización de fragmentos menores a 100 pb productos de la RFLP sobre los amplificadores GP5/GP6.24..... | 23 |
| Resultados..... | 24 |
| Alineamiento de las secuencias del gen L1 DE VPH con los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5/GP6..... | 24 |
| Estandarización de la PCR MY09/ MY11 y PCR-Nested GP5/GP6..... | 26 |
| Estandarización de la RFLP de los amplificadores GP5/GP6..... | 29 |
| Discusión..... | 33 |

Alineamiento de las secuencias del gen L1 DE VPH con los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5/GP6.....34

Estandarización de la PCR MY09/ MY11 y PCR-Nested GP5/GP6.....35

Estandarización de la RFLP de los amplificados GP5/GP6.....36

Conclusiones.....38

Recomendaciones.....39

Bibliografía.....40

www.bdigital.ula.ve

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Árbol filogenético donde se observan 118 tipos de papilomavirus..... | 2 |
| Figura 2. Progresión de lesión condilomatosa benigna a carcinoma invasivo..... | 3 |
| Figura 3. Estructura cristalina de un pentámero de la proteína L1 del VPH 11..... | 3 |
| Figura 4. Organización genómica del virus de papiloma humano..... | 4 |
| Figura 5. Ciclo de vida del VPH..... | 7 |
| Figura 6. Mecanismo de acción de las oncoproteínas E6 y E7 en el proceso de activación de cáncer..... | 8 |
| Figura 7. Esquema general del patrón de digestión virtual de amplificado GP5/GP6 del VPH 53 con las enzimas de restricción HpyCH4V, RsaI, DdeI y AluI mediante el programa nebcutter..... | 20 |
| Figura 8. Algoritmo de las enzimas de restricción utilizadas en la PCR-RFLP de los amplificados GP5/GP6..... | 23 |
| Figura 9. Alineamientos múltiples de las secuencias de los VPH estudiados de la región MY09/MY11 del gen L1..... | 24 |
| Figura 10. Alineamientos múltiples de las secuencias de los VPH estudiados de la región GP5/GP6 del gen L1..... | 25 |
| Figura 11. Amplificación de las regiones MY09/MY11 del gen L1 y PC04/GH2 del gen de la β -globina de los tipos virales 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45, 53, 54, 58, 66 y 81 en muestras de ADN total del área genital de los pacientes voluntarios..... | 26 |
| Figura 12. Amplificación de las regiones MY09/MY11 del gen L1 de los VPH 31, 33, 39, 45, 54, 56, 58, 59, 66 del ADN plasmidico purificados..... | 27 |
| Figura 13. Amplificación de las regiones MY09/MY11 del gen L1 del ADN plasmidico purificado de los distintos tipos de VPH estudiados..... | 27 |
| Figura 14. Amplificación del ADN plasmidico de los VPH 6, 11, 16, 31 con los oligonucleótidos GP5/GP6 del ADN diana amplificado con GP5/GP6 del gen L1 con diluciones de 1/10 y 1/100 para cada uno de ellos..... | 28 |
| Figura 15. Amplificación de los VPH 31, 33, 39, 45 y 53 con los oligonucleótidos GP5/GP6 del ADN diana amplificado con MY09/MY11 del gen L1 con diluciones de 1/10 para cada uno de ellos..... | 28 |
| Figura 16. Amplificación del VPH 53 con los oligonucleótidos GP5/GP6 del ADN diana amplificado con MY09/MY11 del gen L1..... | 29 |
| Figura 17. Amplificación de la región GP5/GP6 del VPH 54 mediante PCR-RFLP con enzimas de digestión DdeI + AluI..... | 31 |

Figura 18. Amplificación de la región GP5/GP6 del VPH 53 mediante PCR-RFLP con la enzima de digestión HpyCH4V y RsaI.....32

Figura 19. Amplificación de la región GP5/GP6 de los VPH 18, 33, 39, 45 y 52 (pozos 2, 3, 4, 5 y 6) mediante PCR-RFLP con la enzima de digestión HpyCH4V.....32

www.bdigital.ula.ve

Índice de Tablas

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Resumen de la longitud aproximada y de las principales funciones de cada ORF de los distintos VPH..... | 5 |
| Tabla 2. Compuestos químicos utilizados en la purificación de ADN plasmidico..... | 16 |
| Tabla 3. Números de acceso en el Gen Bank de las secuencias codificantes del gen L1 para cada tipo de VPH alineado..... | 17 |
| Tabla 4. Enzimas de restricción usadas en la RFLP, cada una con el tampón correspondiente a 100% de actividad..... | 20 |
| Tabla 5. Digestión con enzimas de restricción del algoritmo utilizado del amplificado GP5/GP6 mediante el programa de bioinformática Nebcutter..... | 21 |
| Tabla 6. Componentes del gel de poliacrilamida 6%..... | 23 |
| Tabla 7. Digestión virtual con enzimas de restricción mediante el programa de bioinformática Nebcutter en la región GP5/GP6 del VPH 53..... | 30. |

www.bdigital.ula.ve

Abreviaciones

| | |
|--------------|---|
| ADN | Acido Desoxirribonucleico |
| VPH | Virus de Papiloma Humano |
| dNTP | Desoxinucleótido trifosfato |
| kDa | kiloDalton |
| kb | kilo bases |
| ORF | Marco de lectura abierto |
| pBR | Plásmido retinoblastoma |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| RFLP | Polimorfismo de la longitud de los fragmentos |
| P | Fósforo |
| S | Azúfre |
| I | Iodo |
| Pb | Pares de bases |
| °C | Grado centigrado |
| µl | Micro litro |
| Min | Minutos |
| Rpm | Revoluciones por minuto |
| SN | Sobrenadante |
| mM | Mini molar |
| ng | Nano gramo |
| c.s.p | Cantidad suficiente para |
| U | Unidad de enzima |
| Nm | Nanomolar |

Introducción

Durante la última década, los virus de papiloma humano han incrementado la atención por el interés científico, ya que son cuantitativamente el grupo más importante de virus asociados con neoplasias tanto malignas como benignas en los seres humanos (Chan, 1995). Actualmente el virus comprende más de 100 genotipos diferentes de acuerdo a sus diferencias en las secuencias de ADN como los epitelio trópicos, de los cuales existen más de 30 que son mucoso trópicos (Husman *et al*, 1995 y Reigosa *et al.*, 2015). Además de esto, otros tipos de Virus de Papiloma también han sido identificados en distintas especies de aves y mamíferos inferiores haciendo mayor énfasis en interés de estudio (Chan, 1995).

Caracterización general del virus de papiloma humano.

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es un virus ADN de doble cadena, circular covalentemente cerrado, que infecta el epitelio escamoso en individuos sanos para producir verrugas, condilomas (Villalobos *et al*, 2009) como lesiones benignas, y lesiones pre y neoplásicas como malignas. Su tamaño es de 60nm, pertenece a la familia *Papillomaviridae* la cual sólo incluye a los papilomavirus (ver figura 1). Su molécula de ADN doble banda circular y cerrada es de 7,9 kb y $5,2 \times 10^6$ Da. Hasta el momento se han logrado identificar más de doscientos tipos virales clasificados según la homología de sus genomas, y de acuerdo al riesgo de transformación maligna de la siguiente forma: bajo riesgo: 6, 11, 32, 42, 43, 44, 54 y 81; riesgo intermedio: 50, 51, 52, 53, 58 y 83, y alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 56, 59, 66, 68 y 70 (Quintero *et al*, 2008).

mediante secuenciación, los primeros genomas completos disponibles fueron los de los VPH 1,6 y 16 (De villiers et al., 2004).

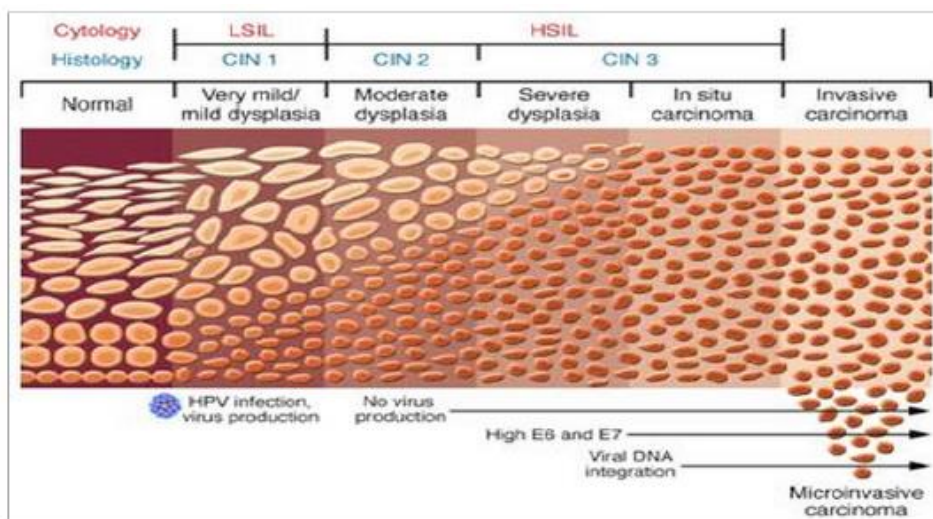


Figura 2. Progresión de lesión condilomatosa benigna a carcinoma invasivo. Fuente: Duazari. Rev.Fac.Cienc.Sal.2011.

Organización genómica del virus del papiloma humano

De acuerdo al estudio de la gran variabilidad genética del VPH se eligió una secuencia correspondiente a la región L1 del genoma (ver figura 3), zona que permite identificar la mayoría de los sub tipos conocidos de este virus (Gómez *et al*, 1995).

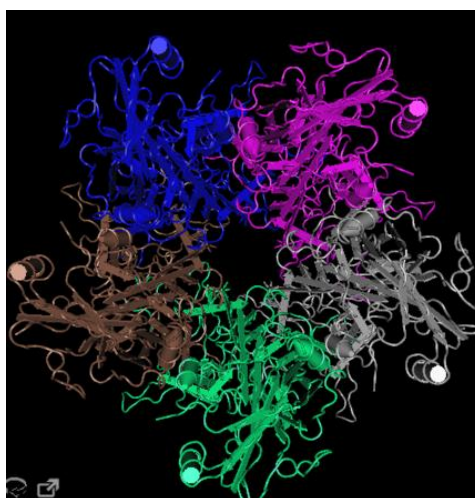


Figura 3. Estructura cristalina de un pentámero de la proteína L1 del VPH 11. Fuente: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=64264>

Los VPH codifican proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6, E7), las cuales juegan un papel fundamental en la replicación y transformación celular del virus y codifican proteínas tardías (L1, L2) que son las que conforman la cápside viral (ver figura 4) del genoma del virus (Avci, 2012). La proteína principal estructural de la cápside (L1) tiene un peso molecular aproximado de 57kDa y está compuesta por 504 aminoácidos (Beltrán, 2014).

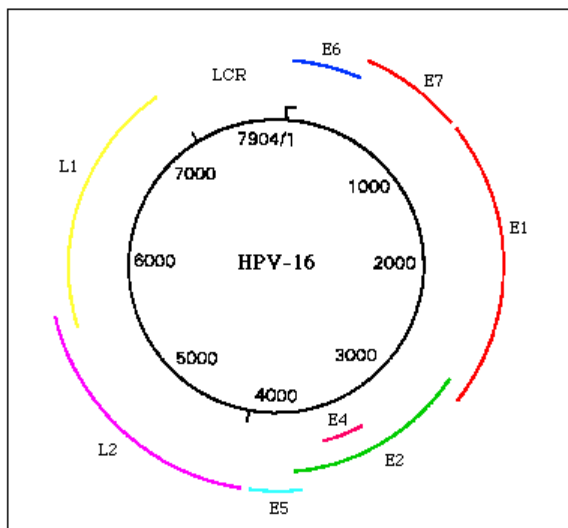


Figura 4. Organización genómica del virus de papiloma humano.

Actualmente se conoce la secuencia completa del genoma de la mayoría de los papilomavirus humanos y animales. La organización general del genoma es muy parecida en todos los tipos. Todas las secuencias potencialmente codificadoras de proteínas (ORF –Open Reading frames- o marcos de lectura abiertos) se localizan en una de las dos cadenas del ADN. La mayor parte de los ORFs ocupan posiciones relativamente similares, y no difieren demasiado en longitud, cada ORF contiene una longitud aproximada y poseen funciones específicas dentro del genoma viral (ver tabla 1) clasificando así cada función para cada tipo de ORF (Arroyo, 2015).

Tabla 1. Resumen de la longitud aproximada y de las principales funciones de cada ORF de los distintos VPH (Arroyo, 2015).

| Región | Longitud aprox | Función | Observaciones |
|--------|----------------|---|--|
| E1 | 2.000pb | Funcion ATPasa y 3'-5' helicasa. Relacionado indirectamente con la inmortalización celular en vph 16 | Codifica para proteínas de 67,5 a 76,2kDa. ORF bastante conservado entre los diferentes tipos de papilomavirus. |
| E2 | 1.100pb | Se divide en 3 dominios funcionales que regulan la transcripción y replicación del ADN viral. La proteína completa E2: activa los promotores virales mediante unión de elementos de respuesta. En vph 16 y 18 E2 suprime los promotores de transcripción de las proteínas E6 y E7. Cuando el VPH se integra en los cromosomas del huésped, la integridad de E2 varia y se sobreexpresan E6 y E7. | Proteína de aproximadamente 45kDa. La función de la proteína E2 esta reprimida por otras dos proteínas E2: el represor transcripcional E2(E2TR) y el represor transcripcional E8/E2(E8/E2TR). |
| E3 | 300pb | No se conoce si este ORF es traducido | Existe solo en BPV1, BPV2, EEPV. |
| E4 | 300pb | Regula los niveles de la proteína nuclear E2 para facilitar la amplificación del genoma viral y la expresión de proteínas tempranas. | Secuencia codificante contenida dentro del marco de lectura E2. Proteína de aproximadamente 10 a 44KDa. Se expresa a partir de un ARNm procesado (E1-E4) de manera abundante durante las etapas tardías del ciclo viral y la replicación vegetativa del ADN viral. |
| E5 | 230-250pb | Proteína de membrana que interacciona con los receptores del factor de crecimiento, estimulando la división celular y la proliferación de células infectadas. | Codifica para proteínas de aproximadamente 14KDa. Proteína de membrana hidrofóbica. Uno de los ORF mas pobremente conservados. Puede expresarse como un ORF único o junto a los ORF's E1-E4 en un ARN policistrónico. |
| E6 | 450-500pb | Proteína de transformación celular y de unión al ADN. Altera el ambiente celular inhibiendo la función de p53 mediante su degradación por la vía de la ubiquitina. | Codifica para proteína de 16-18KDa. E6 y E7 codifican para un único ARN mensajero bicistrónico que se traduce en dos pautas de lectura distintas. Expresión temprana. |
| E7 | 300-320pb | Proteína transformadora relacionada con la integración del genoma vírico en el ADN de la célula huésped y el establecimiento de un alto número de copias en las células infectadas persistentemente. Se une a proteínas celulares supresora de tumores de la familia pRB., que a su vez interactúan con factores de transcripción de la familia E2F, lo que promueve el progreso de la fase s del ciclo celular y por tanto la replicación celular. | Codifica para proteínas de aproximadamente 10KDa. |
| E8 | 200pb | Proteína análoga al ORF E6. | Existe solo en papilomavirus bovinos y en VPH 6. |
| L1 | 1.700pb | Proteína mayoritaria de la cápside, función principalmente estructural. El extremo carboxi terminal es el sitio de señales de localización celular. | Codifica para proteína de aproximadamente 57KDa. Proteína mayoritaria que conforma cerca del 80% de la cápside. Region mayor conservada entre los diferentes tipos de VPH. |
| L2 | 1.400pb | Función de interacción virus-célula. Interacción con proteínas citoplasmáticas de la célula epitelial. Modulación del ciclo viral y la persistencia de la infección. | Codifica para proteína de 43 a 53 KDa. Proteína minoritaria de la cápside, se acumula en estructuras nucleares conocidas como dominios oncogénicos de la proteína de leucemia pro- |

| | | | |
|------------|-------------|--|--|
| | | | monocítica (PML) durante el ensamblaje del virus y atrae a L1 hacia estos dominios. |
| LCR | 800-1.000pb | Contiene varios motivos de regulación de la replicación y la transcripción vírica. Contiene sitios de unión de factores de transcripción y elementos del promotor de la ADN polimerasa. Contiene el origen de replicación. | Tamaño y secuencia muy variable entre los diferentes aislados. No contiene secuencias codificantes. Se divide en 3 partes: el promotor temprano, el amplificador o enhancer y la región más alejada del 5'. Algunos VPH contienen pequeños ORF's integrados en la región LCR. |

Ciclo viral

Los estudios del ciclo viral son importantes para entender el proceso de la formación del cáncer inducido por el virus de papiloma humano. El ciclo de vida del virus está ligado al programa de diferenciación celular de la célula huésped infectada (ver figura 5), el queratinocito, pero solo infecta las células de la capa basal de las membranas cutáneas o mucosas (Nakahara *et al*, 2002 y Pett *et al*, 2006) y puede dividirse en dos etapas: una productiva y otra no productiva. En la etapa no productiva el genoma vírico permanece como un elemento extracromosomal en forma de episoma (elemento genético autoreplicativo). El proceso de infección, ocurre fundamentalmente, a través de receptores de integrinas presentes en las células basales del epitelio estratificado, donde el virus replica su ADN para mantener un número de 50-100 copias del genoma dentro de las células basales y parabasales. Sin embargo, la lesión puede ser iniciada por daños epiteliales pequeños, siendo poco el acceso a las células basales, donde produce un amplio espectro de cambios morfológicos una vez infectadas (León *et al*, 2005). En la etapa productiva, el genoma vírico se amplifica de modo que aumenta el número de copias presentes en la célula y se expresan los genes tardíos que codifican las proteínas de la cápside (Hernández *et al*, 2004).

Debido a que la producción de las partículas víricas está restringida a las placas superiores del epitelio, las células basales no son lisadas durante la producción de los viriones, y así la infección permanece durante largos períodos de tiempo. Podría pensarse que el ciclo vírico productivo y no productivo ocurre de forma independiente, pero sucede dentro de la misma célula (Hernández *et al*, 2004).

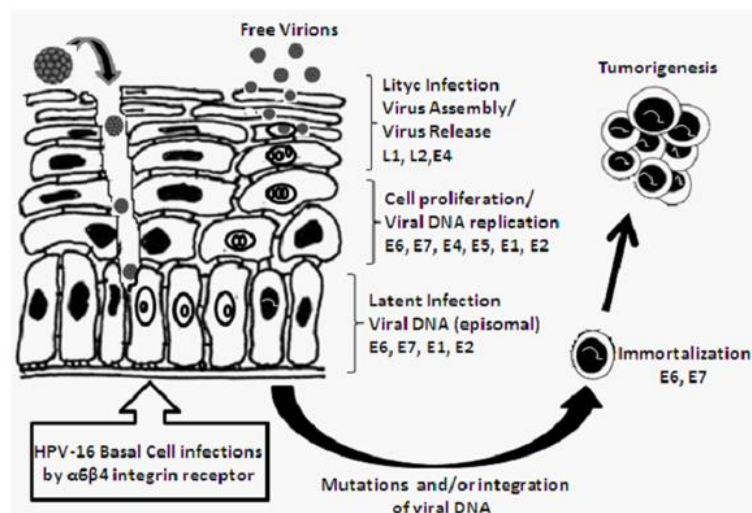


Figura 5. Ciclo de vida del VPH. Se establece la infección latente en las células basales diferenciando el epitelio estratificado donde la replicación viral ocurre a través de las proteínas E6 y E7 provocando la iniciación del tumor cuando los VPH son de alto riesgo.

Fuente: Colomb. Med. vol.42 no.2 Cali Apr./June 2011.

Virus de papiloma humano y cáncer

Los VPH de alto riesgo están altamente relacionados con varios tipos de cáncer, entre los más comunes el cáncer cervical cuya incidencia es mayor en países como África, Centro-América y el Caribe, Sur América y la parte sur-central de Asia (India, Pakistán) (Solidoro, 2006) mientras que los VPH de bajo riesgo están relacionados con lesiones benignas como verrugas genitales (Ghittoni *et al*, 2015). La presencia del virus asociado con el cáncer codifica dos oncoproteínas como lo son E6 y E7 del VPH que contribuyen a la patogénesis del mismo y actúan directamente sobre los genes supresores de tumores como el gen p53 y pBR formando complejos con estos genes (Münger *et al*, 1992). La proteína E7 se une al gen supresor tumoral del retinoblastoma pRB con preferencia por las formas poco fosforiladas del pBR (Münger *et al*, 1992). Debido a la interrupción de los ORF como E1 y E2 se genera sobreexpresión de estas proteínas oncogénicas las cuales favorecen la transformación maligna (Hernández *et al*, 2012). La degradación y pérdida de la actividad de P53 es inducida por la proteína E6. Esta degradación se lleva a cabo a través de la formación de un complejo entre P53, E6 y E6AP. En estado fisiológico, p53 detiene a las células en la fase G1 del ciclo celular e induce apoptosis para permitir la reparación del ADN

huésped. En el caso de E7, este se une al inhibidor de quinasa dependiente de ciclina que resulta en la pérdida de control sobre el ciclo celular (Bansal, *et al.* 2016).

Al adquirir la infección por VPH del tipo oncogénico se tiene un alto grado de incidencia en los mecanismos patofisiológicos de los pacientes infectados produciendo así una cascada de cambios a nivel molecular (Lorenzato *et al.*, 2000). Los VPH oncogénicos del tipo 16 y 18 son los virus más frecuentemente encontrados en adenocarcinomas (Bansal, *et al.* 2016) en contraste con los VPH del tipo 6 y 11 los cuales en su mayoría predominan en verrugas genitales benignas (Lorenzi *et al.*, 2015). El VPH 16 muestra una mayor probabilidad de persistencia en la célula y por lo tanto tiene un mayor impacto en el riesgo de cáncer comparado con el VPH del tipo 18 (Lorenzi *et al.*, 2015).

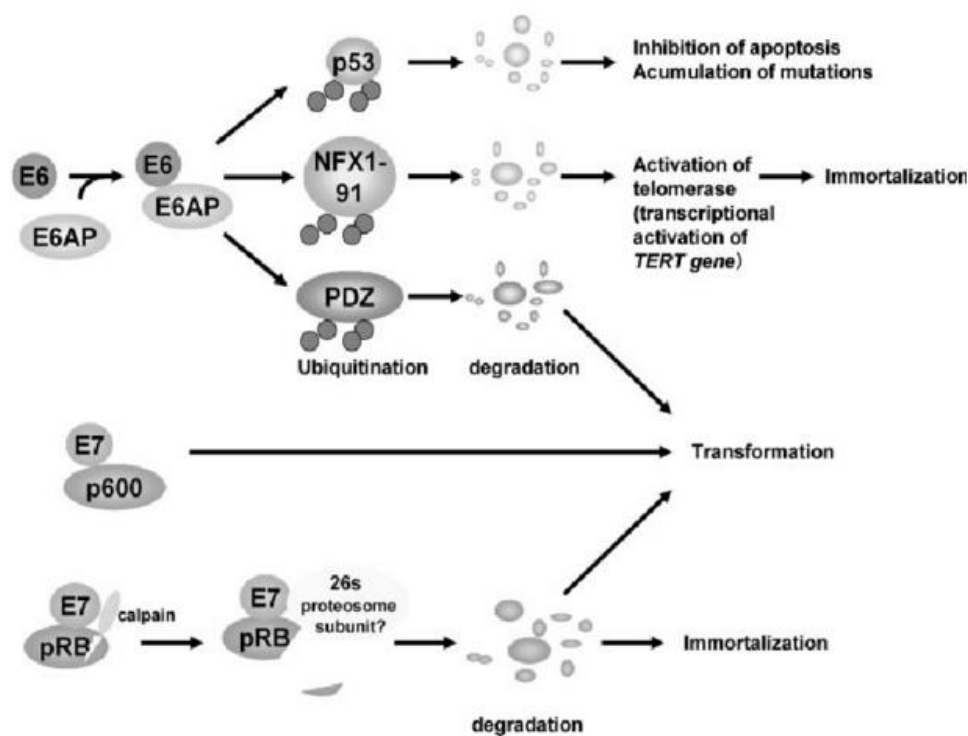


Figura 6. Mecanismo de acción de las oncoproteínas E6 y E7 en el proceso de activación de cáncer. Fuente: https://www.researchgate.net/figure/23804586_fig2_Figure-2-Targets-of-high-risk-HPV-E6-and-E7-E6-binds-to-a-cellular-HECT-domain-E3.

Técnicas moleculares utilizadas en la detección y tipificación del VPH.

La captura de híbrido 2 (HC2) es una técnica que se basa en la hibridación con sondas de ARN complementarias de la secuencia genómica de 13 tipos de VPH de alto riesgo oncogénico (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). La estructura tridimensional específica de este híbrido

la reconoce y captura un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina que está ligado a las paredes de un pozo de microplaca. Los híbridos inmovilizados se detectan mediante adición de un sustrato que reacciona con la fosfatasa alcalina y produce fotones. La luz emitida se mide en un luminómetro y se expresa como unidad relativa de luz (RLU) (Cañadas, 2006).

La técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se llevó a cabo por primera vez en 1983 por Kary Mullis donde utilizó dos iniciadores que se alineaban con cada una de las hebras del ADN, adición de ADN polimerasa I de *Escherichia coli* y nucleótidos trifosforados. Como resultado se obtuvo la replicación exponencial del fragmento de ADN flanqueado por los iniciadores (Mullis, 1987). La PCR puede generar miles de millones de copias de moléculas similares en unas pocas horas, la reacción es fácil de ejecutar ya que solo requiere de muestras en tubos, unos pocos reactivos y una fuente de calor (Mullis, 1990). Esta técnica se basa en la repetición cíclica de tres etapas; en la primera etapa se desnaturaliza el ADN presente en la muestra, lo que separa las dos cadenas sencillas que forman la doble hélice del ADN. Esto se consigue aplicando temperaturas superiores a 90°C. En la segunda etapa se unen específicamente los oligonucleótidos, es decir, fragmentos de ADN de cadena sencilla, con una secuencia de nucleótidos conocida y complementaria al ADN que se pretende amplificar. La temperatura a la que se efectúa la unión de los oligonucleótidos al ADN desnaturalizado es crítica para controlar la especificidad de la reacción y depende exclusivamente de la composición de las bases nitrogenadas de los oligonucleótidos. En la tercera etapa se produce la extensión enzimática de los oligonucleótidos mediante una ADN polimerasa. Después del primer ciclo se obtiene como resultado la duplicación de la secuencia de ADN diana delimitada por la pareja de oligonucleótidos específicos. En el siguiente ciclo la nueva copia de ADN servirá de molde para amplificar el ADN diana, así la cantidad de ADN generado se incrementará exponencialmente (Morcillo *et al*, 2013).

La PCR anidada es una técnica que consiste en amplificar un segmento grande de ADN (700-2000 pb) por la técnica de PCR con un par de iniciadores y posteriormente amplificar con otro par de iniciadores un segmento interno del primer fragmento amplificado es decir esta técnica es una PCR doble y por lo tanto se estima que es mil veces más eficiente que una PCR simple (Rodríguez *et al*, 2009). Esta técnica tiene una alta sensibilidad y sus reacciones consecutivas de

PCR se realizan en dos tubos distintos, en la primera amplificación se utilizan los oligonucleótidos MY y en la segunda amplificación se utilizan los oligonucleótidos GP (Fonseca *et al.*, 2016).

El conjunto de oligonucleótidos MY09-MY11 se sintetiza como un conjunto o pool de varios nucleótidos degenerados, siendo por lo tanto una mezcla de 25 oligonucleótidos, capaces de amplificar un amplio espectro de varios tipos de VPH. El conjunto de oligonucleótidos GP5-GP6 se compone de una secuencia de nucleótidos fijos para cada primer y detecta una amplia gama de distintos tipos de VPH utilizando una baja temperatura de alineamiento durante la PCR (Qu, 1997).

Otro procedimiento es la hibridación *in situ* que utiliza sondas específicas para detectar los diferentes genotipos de VPH, este método tiene como ventaja que da la localización celular del virus, pero no es muy sensible ya que para realizar un diagnóstico se necesita una alta concentración viral en las células (más de 50 copias del virus por célula) (Garnica, 2011).

La hibridación *in situ* consiste en desnaturalizar el ADN cromosómico por calor (95 °C) y posteriormente añadir una solución que contiene la sonda con el ADN o ARN marcado, que hibridará con sus secuencias complementarias. El marcado de las sondas se puede hacer por radiactividad con P^{32} , S^{35} , o I^{125} y posteriormente detectarse por autorradiografía. El marcado por biotina o dioxigenina es visualizada por una reacción colorimétrica (Lleonart *et al.*, 1997).

En cuanto a la tipificación viral, se utiliza la RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, por sus siglas en inglés) utilizada en ingeniería genética, esta técnica consiste en que después de amplificar mediante PCR un fragmento de ADN diana, los amplicones se tratan con enzimas de restricción, y si estas encuentran la diana en el fragmento amplificado rendirán distintos fragmentos, según la especie. Por esto se denomina también PCR-RFLP o análisis de polimorfismo de los fragmentos de restricción (Morcillo *et al.*, 2013).

En este sentido, se ha sugerido como un método molecular de gran utilidad en el diagnóstico y seguimiento de la presencia y persistencia del VPH de alto riesgo. Su uso demostró ser útil en la identificación de múltiples infecciones de VPH tal como en la detección de nuevos tipos de los mismos. La PCR-RFLP presenta mayor validez que los métodos morfológicos, mostrando una

sensibilidad de 100 %, una especificidad de 99 % y un valor predictivo negativo de 100 % respecto al diagnóstico histopatológico (Medina *et al*, 2012)

Antecedentes

En 1907 se iniciaron los estudios de los papilomas virus cuando Ciuffo sugirió que el agente causal de unas verrugas producidas en humanos, se podrían asociar con un virus. En la actualidad los conocimientos que se han obtenido sobre este virus se deben en su gran mayoría a técnicas de biología molecular ya que ha sido el método más efectivo para conocer la organización genómica, las funciones de los genes virales y los tipos de VPH (Arapé, 2006)

En 1983, Zur Hausen descubrió la presencia de una forma de virus del papiloma humano, llamado VPH 16 en tumores de cáncer cervical. Un año después el descubrió un segundo tipo de VPH (VPH 18) en tumores cervicales similares. Su descubrimiento fue recibido con seria duda por parte de los investigadores del cáncer ya que la teoría predominante en ese momento era que un tipo diferente de virus, el responsable de que el herpes simple, fuese el agente causal en el cáncer de cuello uterino (David, 2010).

En 1934, Francis Peyton Rous demostró que el virus de papiloma puede causar cáncer de piel en conejos que han sido infectados, pasando la lesión de tumor benigno, es decir, las verrugas; progresando hasta carcinomas malignos y que los carcinógenos químicos podrían interactuar con el virus (Kumar *et al.*, 2013)

En 2011, Coser y colaboradores realizaron un estudio de detección y tipificación de VPH con PCR-RFLP nested donde usaron el par de oligonucleotidos externos MY09/MY11 en una primera amplificación y la compararon con el par de oligonucleótidos fijos GP5+/GP6+ en una segunda reacción, donde hubo una alta sensibilidad en las muestras cervicales estudiadas con la PCR nested en comparación con la amplificación de la PCR que contienen solamente los oligonucleótidos MY09/MY11, lo cual fue posible gracias al diseño de este nuevo par de oligonucleótidos externos degenerados para la región del producto amplificado MY09/MY11 y el uso de bajas condiciones rigurosas (Coser *et al.*, 2011)

Hipótesis de trabajo

El desarrollo de un algoritmo de tipificación utilizando la región GP5/GP6 mediante la técnica PCR-RFLP y electroforesis en geles de poliacrilamida sumergidos, nos permitiría detectar y tipificar los distintos tipos de VPH en muestras con bajas concentraciones de ADN viral.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos

- **Objetivo general:**

Detectar y tipificar VPH en muestras de ADN total, mediante el análisis PCR-RFLP del amplificado GP5/ GP6 del gen L1 utilizando geles de poliacrilamida sumergidos.

- **Objetivos específicos:**

1. Seleccionar muestras de ADN de participantes voluntarios que asisten a la consulta pública/privada y que solicitan una prueba molecular de tipificación del virus.
2. Diseñar un algoritmo basado en el análisis PCR-RFLP, que permita la tipificación del VPH en las muestras seleccionadas
3. Estandarizar la técnica PCR-RFLP para la detección y tipificación de VPH en muestras de ADN utilizando el algoritmo.

Justificación

Diversos estudios se han enfocado en desarrollar técnicas PCR-RFLP para la detección y tipificación de VPH, siendo la más utilizada la PCR anidada de la región L1 flanqueada por los oligonucleótidos consenso MY09/MY11, seguida de otra amplificación (anidada) con el par GP5/GP6.

De esta manera, el desarrollo de estrategias de análisis PCR-RFLP sobre la región amplificada MY09/MY11 de alta sensibilidad permite la detección y tipificación del VPH que es de difícil tipificación por otras técnicas convencionales. Sin embargo, la RFLP aplicada al fragmento generado por el par de oligonucleótidos GP5/GP6 no es de fácil aplicación pues es de tamaño pequeño (150pb) y al digerirse con las enzimas de restricción adecuadas produce un patrón con fragmentos más pequeños aún, que no puede resolverse fácilmente en geles de agarosa convencionales. No obstante, la estrategia PCR-RFLP anidada MY09/MY11 con GP5/GP6 es de muy alta sensibilidad, pudiéndose detectar la presencia del virus en muestras de pobre calidad, que provienen de pacientes con baja carga viral, o con baja producción de virus debido a su inserción en el genoma. Por tanto sería ventajoso poder tipificar a partir de este sistema anidado.

Por lo tanto, la implementación de una RFLP utilizando una matriz distinta a la agarosa para la electroforesis, permitiría poder obtener una mejor resolución del patrón de bandas y una identificación precisa del tipo viral, la resina o matriz a utilizar sería la poliacrilamida, la cual permite realizar geles más resistentes a la manipulación, de mayor resolución y más nítidos, permitiendo la fijación del colorante de una forma más específica a la molécula de ADN (Cruz, j. 2015). Así la adaptación de un gel de poliacrilamida a un sistema de electroforesis sumergida o submarino, permitiría resolver los patrones de la RFLP y entonces la identificación precisa del virus.

Materiales y métodos

Material biológico

Cepillados del área genital.

Para este trabajo se seleccionaron 30 muestras de ADN total, extraídas a partir de cepillados o hisopados del área genital de participantes voluntarios que acuden a las instalaciones de LABIOMEX-ULA, para solicitar una prueba molecular de detección y tipificación de VPH.

El procedimiento de extracción del ADN de las muestras se realizó en LABIOMEX-ULA, mediante técnicas de extracción, según adaptaciones del protocolo utilizado por Quintero *et al*, 2008. Brevemente, el cepillo con la muestra es sumergido en un volumen de una solución Chelex-100 (Sigma co.) al 5%, por media hora a toda la noche a 37°C. A continuación se retira el cepillo y la solución restante es sometida a calentamiento por 10 min a 94°C. Al enfriarse se centrifuga a alta velocidad en micro centrifuga Eppendorf, por 10 min para bajar la resina y retirar el sobrenadante. Se almacena a 4°C hasta su uso.

El plásmido pBR322 se utilizó para clonar un fragmento del gen L1 de los 17 genomas de VPH más comunes en el estado Mérida, esto se realizó en un estudio previo (Fernández, L., 2009). Los plásmidos fueron transformados y cultivadas las células para su posterior extracción, que se describe a continuación.

Purificación de ADN plasmídico

Se realizó una purificación de ADN plasmídico de la colección de plásmidos clonados según el protocolo de Fernandez, 2009, donde se resuspendieron las células en 200µl de solución I y se mantuvieron en hielo por 15min, luego se añadieron 400µl de solución II fría. Se mezcló por inversión y se mantuvo en hielo por 5min. Se añadieron 300µl de solución III, vortex (ver tabla 2). Se mantuvo por 5min en hielo. Se centrifugaron a 12000rpm por 10min para bajar el precipitado blanco que se forma. Se transfirió el SN a un tubo limpio. Se añadió el Isopropanol frío (1vol) y se guardó en frío por 30min. Se centrifugó a 14000 rpm por 15min. Se descartó SN y se lavó el pellet con etanol 70% por 15min a -20°C. Se centrifugó por 10min a 12000rpm. Se descartó SN y se secó el pellet. Se disolvió el pellet en 15µl de agua. Se guardó el pellet a 4°C. se midió la D.O. para determinar la pureza del ADN (Maniatis, 2001).

Brevemente, las células se resuspenden en tampón de lisis, SDS y proteinasa K, luego son incubadas a 55 °C durante 2 h, y seguidamente se agrega la resina Chelex-100 al 5%. Después de 30 minutos de incubación a 37°C, se calienta por 10 min a 95 °C. Se centrifuga por 10min a 10mil rpm y se almacenan en frío hasta su uso.

Tabla 2. Compuestos químicos utilizados en la purificación de ADN plasmídico.

| <u>Soluciones</u> | <u>Comp. quim.</u> | <u>[x]</u> | <u>PM (g/mol)</u> |
|-------------------|----------------------------------|--------------------|-------------------|
| <u>I</u> | <u>Glucosa</u> | <u>50mM</u> | <u>180</u> |
| | <u>Tris- HCL</u> | <u>250mM</u> | <u>121</u> |
| | <u>EDTA</u> | <u>10mM</u> | <u>372</u> |
| <u>II</u> | <u>NaOH</u> | <u>0,2 N</u> | <u>40</u> |
| | <u>SDS</u> | <u>1% (P/V)</u> | <u>288,3</u> |
| <u>III</u> | <u>Acetato de K</u> | <u>5M</u> | <u>5</u> |
| | <u>Acido Acético glacial</u> | <u>29,5ml</u> | <u>60</u> |
| | <u>H2O</u> | <u>hasta 100ml</u> | <u>18</u> |

Alineamiento de las secuencias del gen L1 DE VPH con los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5/GP6.

Para realizar el alineamiento se escogen las secuencias de los tipos de VPH de alto y bajo riesgo más comunes en la población que presentan verrugas genitales y los que más se detectan en lesiones pre cancerosas y en NIC III (Blanco, 2011). Los genomas escogidos son los siguientes: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 53, 54, 56, 58, 66 y 81, anteriormente clonados en plásmido pBR322, según se menciona antes.

Las secuencias de los VPH se obtuvieron del GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (ver tabla 3). El alineamiento se realizó con los oligonucleótidos GP5/GP6 mediante el programa BioEdit sequence alignment versión 7.0.0 2004.

Tabla 3. Números de acceso en el Gen Bank de las secuencias codificantes del gen L1 para cada tipo de VPH alineado.

| VPH | Gen Bank | VPH | Gen Bank | VPH | Gen Bank |
|-----|------------|-----|------------|-----|------------|
| 6 | AF335604.1 | 33 | GQ479012.1 | 54 | U37488.1 |
| 11 | AF335603.1 | 39 | JN104070.1 | 58 | HM639663.1 |
| 16 | DQ469930.1 | 45 | KU049757.1 | 59 | X77858.1 |
| 18 | EU834744.1 | 52 | JN874436.1 | 66 | U31794.1 |
| 31 | J04353.1 | 53 | NC_001593 | 81 | AJ620209.1 |

Estandarización de la PCR MY09/ MY11 y PCR-Nested GP5/GP6

Previamente se utilizaron las muestras de ADN de las muestras seleccionadas, las cuales se sometieron a una PCR que amplifica un fragmento del gen de la β -globina utilizando el par de oligonucleótidos PC04/GH20, para determinar la calidad del ADN. Las secuencias de los oligonucleótidos PC04/GH20 son las siguientes:

PC04 : 5' CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC 3'
 GH20 : 5' GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC 3'

Seguidamente las muestras positivas para el sistema Beta-Globina, se sometieron a amplificación de una región del gen L1 utilizando los oligonucleótidos MY09/MY11 originando un amplificado aproximado de 450 pb utilizando el protocolo de Manos y col, previa a la amplificación con los oligonucleótidos MY09/MY11 las muestras fueron centrifugadas a 12000rpm por 10 minutos. Igualmente, para los ADN de plásmidos purificados las muestras fueron previamente sometidas a diluciones de 1/10 y 1/100. Las secuencias de los oligonucleótidos MY09/MY11 son las siguientes:

MY09: 5' CGTCCMARRGGAWACTGATC 3'
 MY11: 5' GCMCAGGGWCATAAYAATGG 3'

*M=A+C, R=A+G, W=A+T, Y=C+T

El ADN plasmídico extraído fue sometido a PCR utilizando una mezcla de reacción (para 50 reacciones) con los oligonucleótidos MY09/MY11 que contiene: 125 ng de buffer (10x), MgCl₂ (50mM), dNTP's (10mM) con 2,5mM de cada dNTP, 1 ng de los oligonucleotidos MY09/MY11, 43U de taq polimerasa LABIOMEX (la cual fue agregada al momento), 2ng de ADN (diluido), 950 µl de agua mega pura c.s.p para un volumen total de 1250µl.

El programa con el que se realizó la amplificación consta de 35 ciclos de 5 minutos a 95°C, 30 segundos a 95°C, 45 segundos a 55°C, 45 segundos a 72°C y por último 1 minuto a 72°C.

Para la PCR-Nested GP5/GP6 se realizó una segunda amplificación, incluyendo las muestras que resultaron negativas en la amplificación anterior, utilizando como diana el amplificado MY09/MY11, los oligonucleótidos GP anclan dentro de la región del amplificado MY y generan un nuevo amplificado de unos 150 pb.

Las muestras fueron sometidas igualmente a diluciones de 1/10 y 1/100 previas a su amplificación para una mayor observación de las muestras que contienen gran cantidad de ADN y que son difíciles de visualizar. Las secuencias de los oligonucleótidos GP5/GP6 son las siguientes:

GP5: 5' **TTTGTTACTGTGGTAGATAC** 3'

GP6: 5' **GAAAAATAAACTGTAATCA** 3'

Para el ADN diana amplificado de MY09/MY11 se utilizaron los oligonucleótidos GP5/GP6 con una mezcla de reacción para 25 reacciones que contiene: 62,5 ng de buffer (10x), MgCl₂ (50mM), dNTP's (10mM) con 2,5mM de cada dNTP, 1 ng de oligonucleotidos GP5/GP6, 65 U de taq polimerasa LABIOMEX (la cual fue agregada al momento), 2ng de ADN, 450 µl de agua mega pura c.s.p para un volumen total de 625 µl de reacción.

El programa utilizado para este sistema consta de 30 ciclos de 5 minutos a 95°C, 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 40°C, 1 minuto a 72 °C y finalmente 2 minutos a 72°C.

Para las reacciones se utilizo un termociclador (*Mastercycler® flexlid nexus eppendorf*) y los resultados fueron observados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 6% en tampón TBE 0,5X adaptados para un sistema horizontal sumergido.

Estandarización de la RFLP de los amplificados GP5/GP6.

Mediante el sistema de PCR GP5/GP6 se obtiene un segmento del gen L1 de VPH de 140pb. El producto de PCR se somete a RFLP con las enzimas de digestión HpyCH4V, RsaI, DdeI y AluI, las cuales fueron escogidas para generar una población de fragmentos más pequeños, pero idealmente, no más de tres fragmentos, para ello se realizo una RFLP virtual Nebcutter2.0 de New Englan Biolab de acceso gratuito (ver Tabla 5). Cada muestra problema de ADN total y ADN plasmídico, fue tipificada en base al patrón de digestión y estableciendo comparaciones con trabajos anteriores (Bernard y col., 1994).

La mezcla de reacción de la digestión consta de 1X de tampón NEB 10Xparacadaenzima, 1U de enzima (HpyCH4V, RsaI, DdeI o AluI), producto de PCR 7µl para un volumen final de 10µl (ver tabla 4). La reacción se incubo por 6 horas a 37°C y se inactivo a 65°C por 15min.

Tabla 4.Enzimas de restricción usadas en la RFLP, cada una con el tampón correspondiente a 100% de actividad.

| Enzima | Tampón 10X |
|---------|------------|
| HpyCH4V | 4 |
| RsaI | 1 |
| DdeI | 3 |
| AluI | 2 |

Para la digestión virtual se analizó el posible patrón con las enzimas de restricción HpyCH4V, AluI, DdeI y RsaI, respectivamente de la secuencia del VPH 53 (ver figura 7).

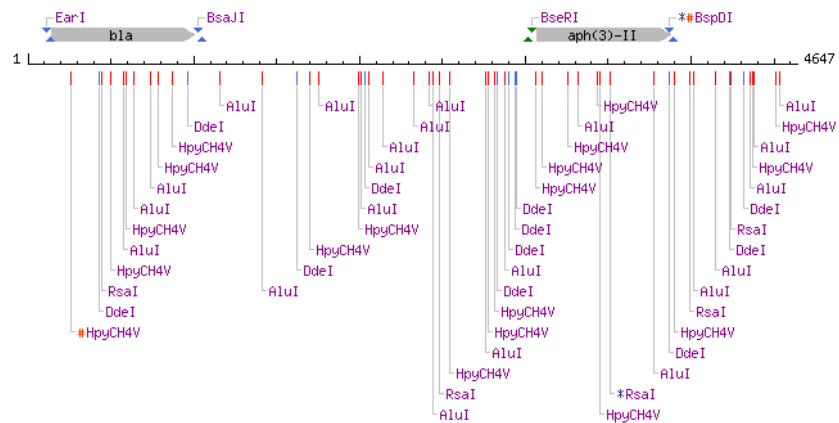


Figura 7. Esquema general del patrón de digestión virtual de amplificado GP5/GP6 del VPH 53 con las enzimas de restricción HpyCH4V, RsaI, DdeI y AluI mediante el programa nebcutter. Tomado de: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>

Tabla 5. Digestión con enzimas de restricción del algoritmo utilizado del amplificado GP5/GP6 mediante el programa de bioinformática Ncbutter.

| Enzimas de restricción | Cortes en pares de bases (Pb) |
|------------------------|-------------------------------|
| HpyCH4V-HpyCH4V | 159 |
| AhI-HpyCH4V | 135 |
| AhI-AhI | 132 |
| AhI-HpyCH4V | 120 |
| DdeI-HpyCH4V | 114 |
| AhI-AhI | 100 |
| AhI-DdeI | 99 |
| AhI-AhI | 95 |
| HpyCH4V-DdeI | 94 |
| HpyCH4V-HpyCH4V | 90 |

Estandarización de la electroforesis en geles de poliacrilamida para la visualización de fragmentos menores a 100 pb productos de la RFLP sobre los amplificadores GP5/GP6.

Los productos digeridos se analizaron utilizando geles de poliacrilamida 6% en buffer TAE 0,5X para obtener diferentes patrones de bandas, los cuales se pueden comparar con un mapa de restricción de referencia (ver fig.7). El producto de los amplificadores se corrieron en geles de poliacrilamida 29:1 (acrilamida-bisacrilamida) en tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X lo suficiente para cubrir el gel, con 3ul en total incluyendo el buffer de carga con glicerol para cada pozo del gel, cuidando de no formar burbujas ni dañarlo. En uno de los pozos del gel se le añade una escalera de bajo peso molecular (50 pb *New England Biolabs*) que en este caso fue preparada en el laboratorio, la cual servirá de guía para identificar el tamaño del amplificado. Los geles fueron preparados en un equipo de electroforesis y con una composición de acrilamida, agua, persulfato y TEMED para un volumen final de 25ml(ver tabla 5) utilizando un peine de 15 pozos. La corrida se realizó en una fuente de poder mini run GE-100 a un voltaje constante de 100-120 v. Posterior a su corrida electroforética, el gel se coloca en bromuro de etidio al 0,0001% en agua destilada de 15 a 30 min para teñir el ADN presente en el gel y posteriormente visualizarlo bajo luz UV con la ayuda de un transiluminador (UVP®) y poder así observar las bandas de la digestión a una longitud de onda de 302nm. Esta técnica ha sido adaptada y optimizada en LABIOMEX para la resolución de amplificadores que provienen de muestras complejas o de baja calidad (Cruz, J. 2015). Los geles fueron fotografiados en un equipo especial de fotografía UV (UPV® PhotoDoc-It) y las fotografías digitalizadas se visualizaron utilizando el programa Cannon Utilitis Windows versión 1.0.0.

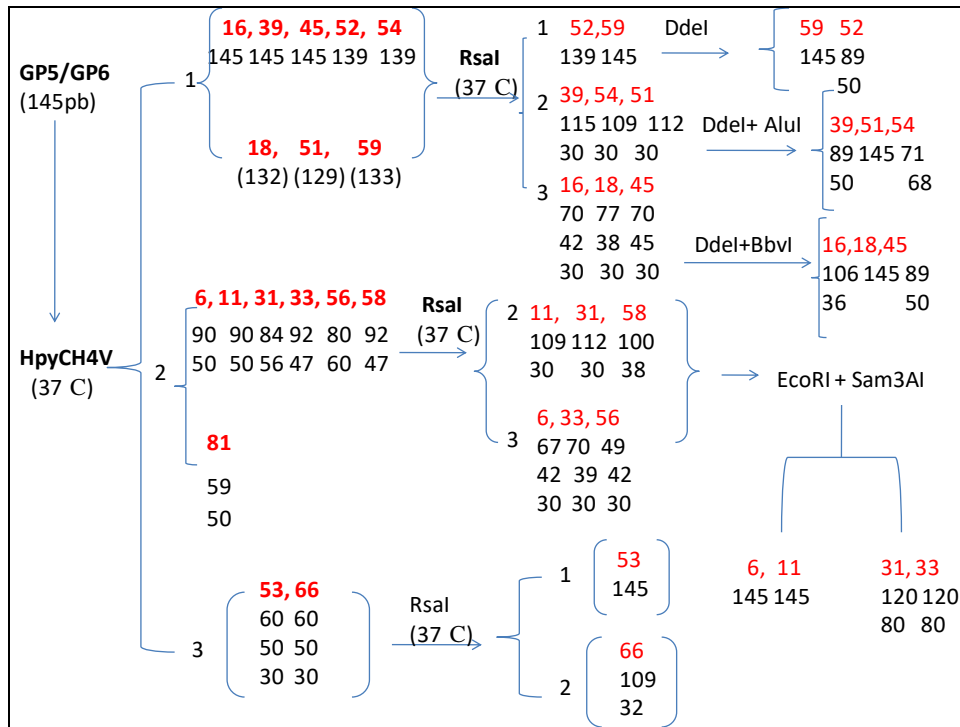


Figura 8. Algoritmo de las enzimas de restricción utilizadas en la PCR-RFLP de los amplificadores GP5/GP6.

Tabla 6. Componentes del gel de poliacrilamida 6%.

| Componentes con concentración inicial | Volumen (ml) |
|---|--------------|
| poliacrilamida 30% | 6ml |
| Agua destilada | 18,8ml |
| Buffer TAE 50X | 0,250ml |
| TEMED (N.N.N'.N'- Tetrametil-etilendiamina) | 0,080ml |
| Persulfato de amonio | 0,800ml |

Resultados

Alineamiento de las secuencias del gen L1 DE VPH con los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5/GP6.

Las secuencias para la región del gen L1 de los distintos VPH estudiados que se obtuvieron del Gen Bank (ver tabla 3) se alinearon con el programa BioEdit sequence alignment versión 7.0.0 2004.

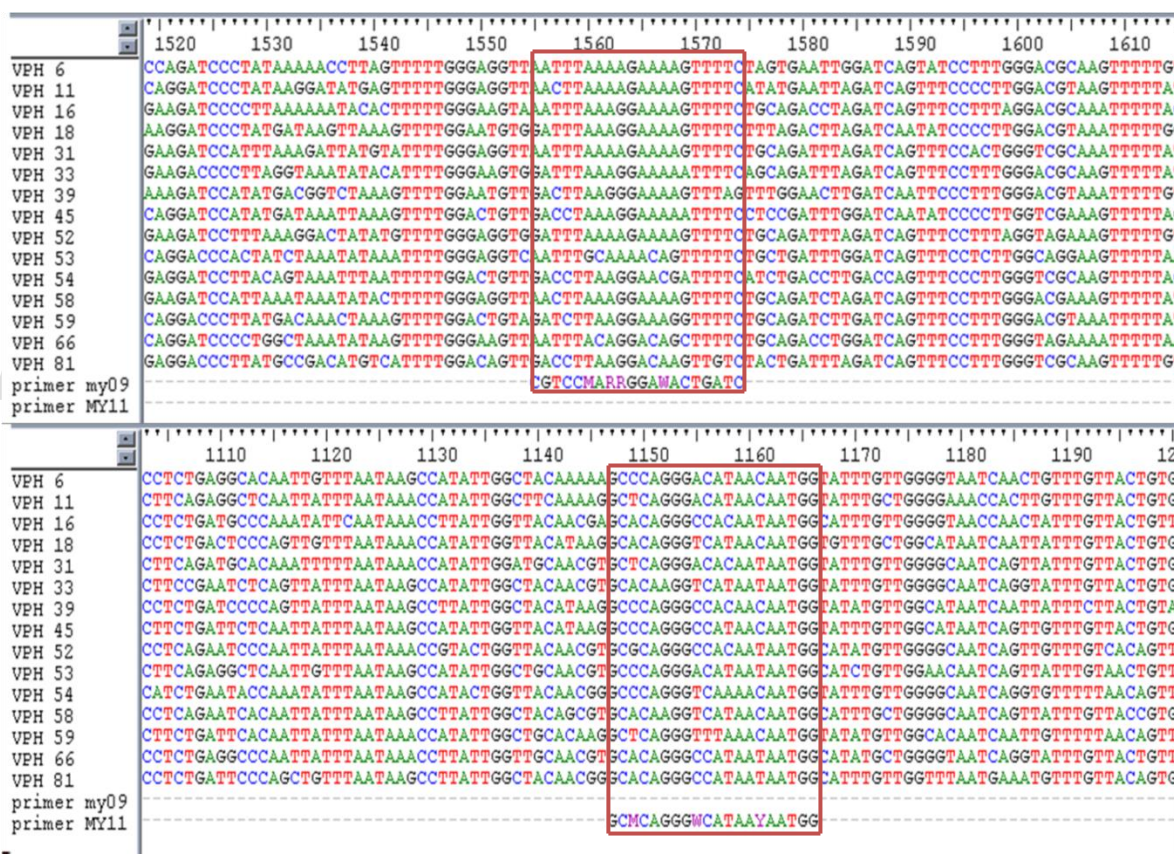


Figura 9. Alineamientos múltiples de las secuencias de los VPH estudiados de la región MY09/MY11 del gen L1.

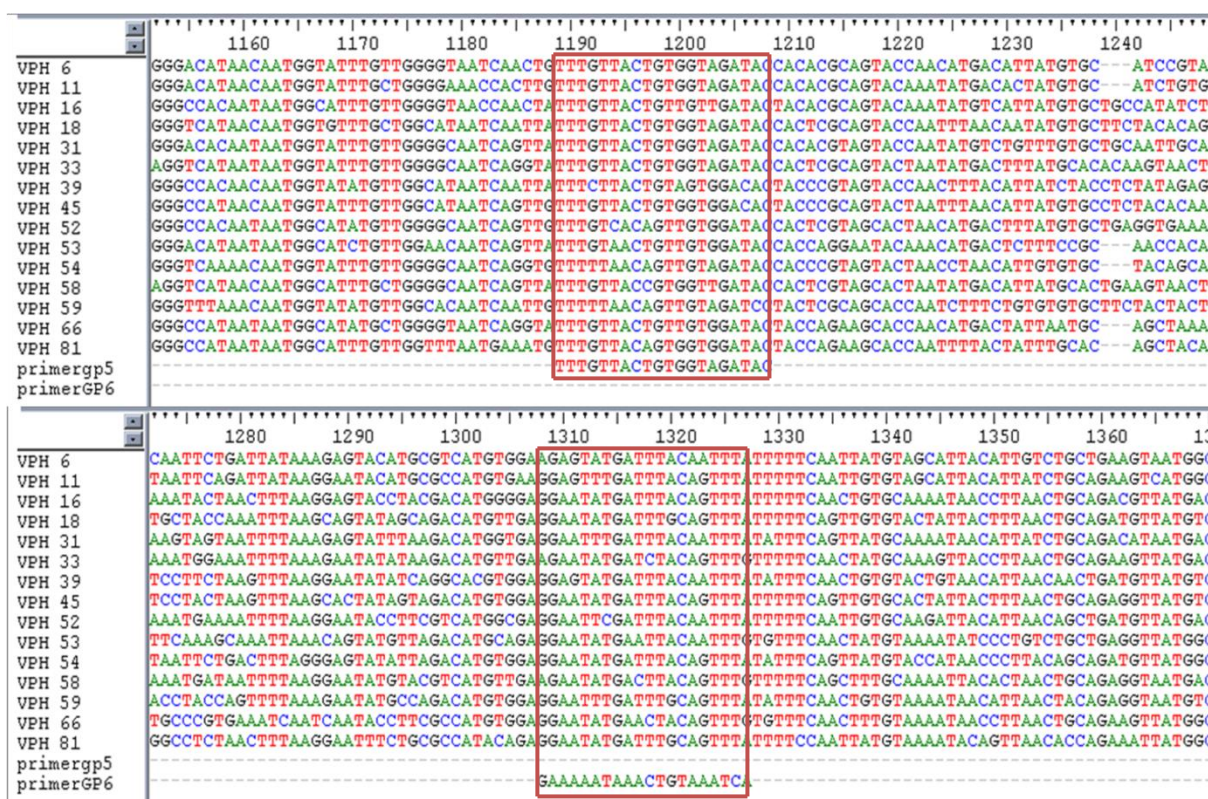


Figura 10. Alineamientos múltiples de las secuencias de los VPH estudiados de la región GP5/GP6 del gen L1.

El alineamiento tuvo un porcentaje de similitud del 100% solamente en regiones cuyos aminoácidos están marcados con el mismo color.

Estandarización de la PCR MY09/ MY11 y PCR-Nested GP5/GP6

Para realizar la estandarización de las muestras de ADN total con las muestras de cepillado del área genital de los pacientes, previamente purificados en LABIOMEX, se sometieron a la técnica de PCR β globina mediante amplificación con los oligonucleótidos PC09/GH20 y la técnica PCR MY09/MY11 simultáneamente en una primera amplificación (ver figura 10) y con el procedimiento descrito en la metodología se sometieron a PCR solamente con los oligonucleótidos MY09/MY11, tanto las muestras de ADN total como las muestras de los plásmidos purificados (ver figuras 11 a 15), originándose como resultados bandas de 268pb para el gen de la β globina y 450pb para el gen L1. Estas muestras se analizaron encontrándose negativas en algunos tipos de VPH tanto para el gen de la β globina como para la región MY09/MY11(450pb de longitud) del gen L1 como las observadas en la figura 11. A todas las muestras de los amplificadas con MY09/MY11 se les

Resultados

realizo la reacción anidada con los oligonucleótidos GP5/GP6 (140pb de longitud). Cabe destacar que el control positivo en todos los casos de la reacción anidada fue el amplificado de la región GP5/GP6 extraído del ADN plasmídico para cada tipo viral.

A continuación se presentan los geles de poliacrilamida al 6% de cada uno de los amplificados del ADN total y plasmídico para las regiones MY09/MY11 del gen L1 y β globina:

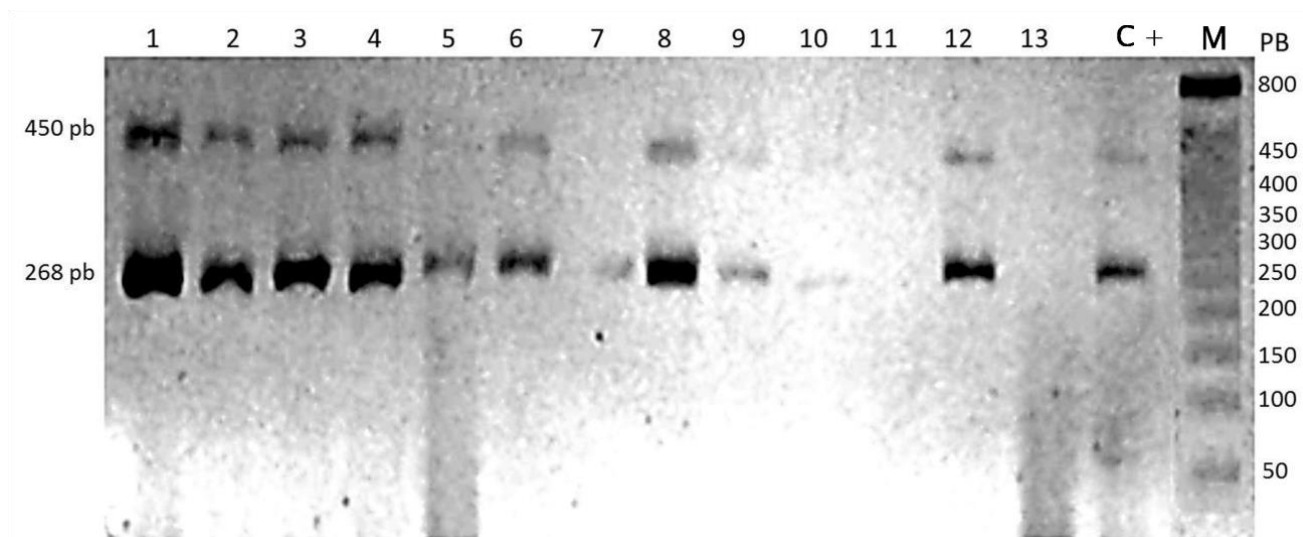


Figura 11. Amplificación de las regiones MY09/MY11 del gen L1 y PC04/GH2 del gen de la β - globina de los tipos virales 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45, 53, 54, 58, 66 y 81 en muestras de ADN total del área genital de los pacientes voluntarios. C+: control positivo. M: marcador de peso molecular (Low Molecular Weight DNA ladder New England Biolabs). Gel de poliacrilamida 6%.

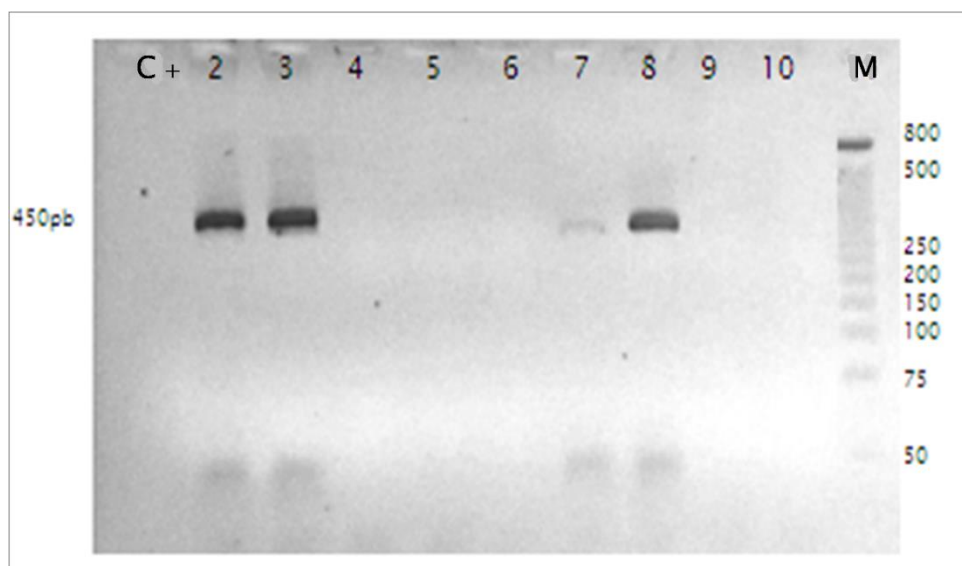


Figura 12. Amplificación de las regiones MY09/MY11 del gen L1 de los VPH 31, 33, 39, 45, 54, 56, 58, 59, 66 del ADN plasmídico purificados. C+: control positivo. M: marcador de peso molecular. Gel de poliacrilamida 6%.

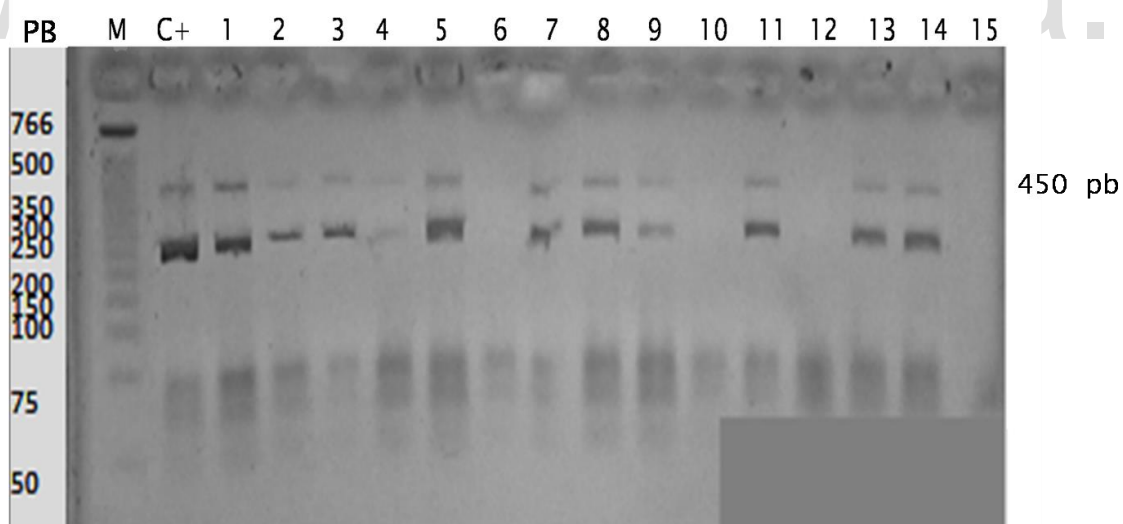


Figura 13. Amplificación de las regiones MY09/MY11 del gen L1 del ADN plasmídico purificado de los distintos tipos de VPH estudiados.

Resultados

Para la PCR nested se presentan los geles de poliacrilamida al 6% de cada uno de los ADN plasmídicos amplificados con los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5/GP6 anidados para los VPH 6, 11, 16, 31, 33, 39, 45 y 53:

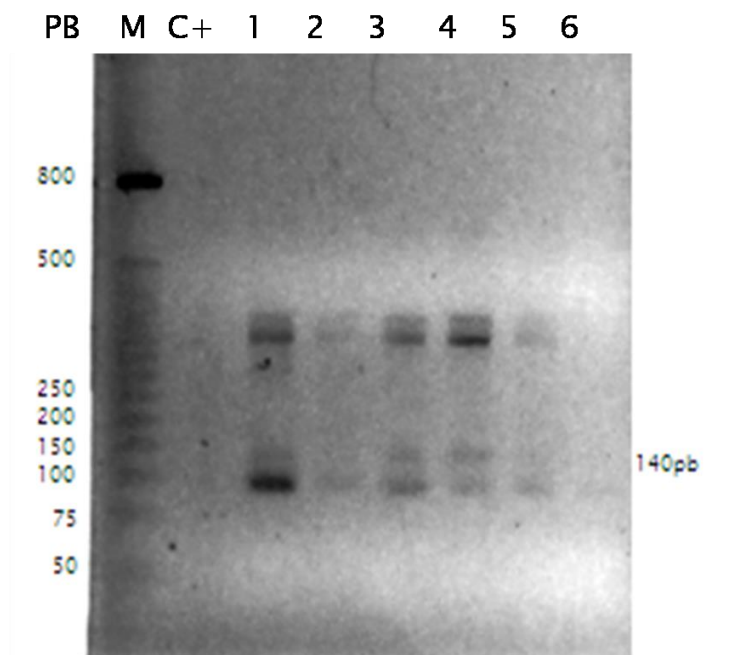


Figura 14. Amplificación del ADN plasmídico de los VPH 6, 11, 16, 31 con los oligonucleótidos GP5/GP6 del ADN diana amplificado con GP5/GP6 del gen L1 con diluciones de 1/10 y 1/100 para cada uno de ellos.

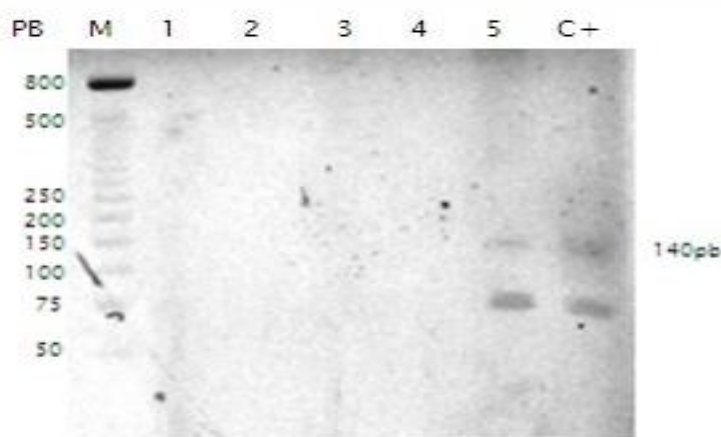


Figura 15. Amplificación de los VPH 31, 33, 39, 45 y 53 con los oligonucleótidos GP5/GP6 del ADN diana amplificado con MY09/MY11 del gen L1 con diluciones de 1/10 para cada uno de ellos.

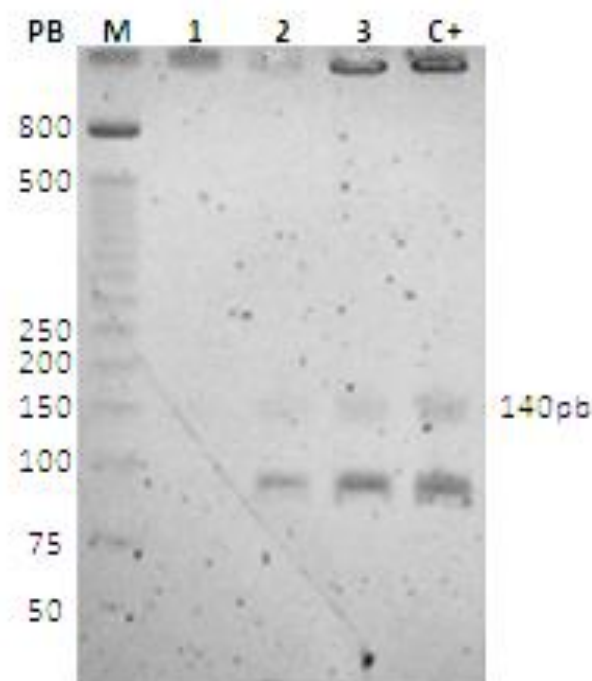


Figura 16. Amplificación del VPH 53 con los oligonucleótidos GP5/GP6 del ADN diana amplificado con MY09/MY11 del gen L1.

Estandarización de la RFLP de los amplificados GP5/GP6.

La estandarización de la RFLP se obtiene directamente del amplificado proveniente del sistema de PCR GP5/GP6 del gen L1 de VPH de una longitud de 140pb. El producto de PCR se somete a RFLP con las enzimas de digestión HpyCH4V, RsaI, DdeI y AluI (ver tabla 6), las cuales fueron escogidas para generar una población de fragmentos más pequeños, pero idealmente, no más de tres fragmentos, los cuales pudieran detectar de manera más específica cada uno de los VPH anteriormente estudiados. Cada muestra fue tipificada en base al patrón de digestión y estableciendo comparaciones con trabajos anteriores (Bernard y col).

Tabla 7. Digestión virtual con enzimas de restricción mediante el programa de bioinformática Ncbutter en la región GP5/GP6 del VPH 53.

| enzimas de restricción | (pb) |
|------------------------|------|
| AluI-HpyCH4V | 135 |
| AluI-AluI | 132 |
| AluI-HpyCH4V | 120 |
| DdeI-HpyCH4V | 114 |
| AluI-AluI | 100 |
| AluI-DdeI | 99 |
| AluI-AluI | 95 |
| HpyCH4V-DdeI | 94 |
| HpyCH4V-HpyCH4V | 90 |

| enzimas de restricción | (pb) |
|------------------------|------|
| AluI-AluI | 90 |
| HpyCH4V-RsaI | 90 |
| AluI-DdeI | 83 |
| RsaI-DdeI | 77 |
| DdeI-HpyCH4V | 75 |
| HpyCH4V-AluI | 73 |
| HpyCH4V-RsaI | 66 |
| RsaI-HpyCH4V | 63 |
| RsaI-HpyCH4V | 55 |
| HpyCH4V-AluI | 55 |

www.bdigital.ula.ve

A continuación se presentan los geles de poliacrilamida al 6% con el patrón de digestión de las respectivas enzimas de digestión (ver tabla 6) de los amplificados GP5/GP6:

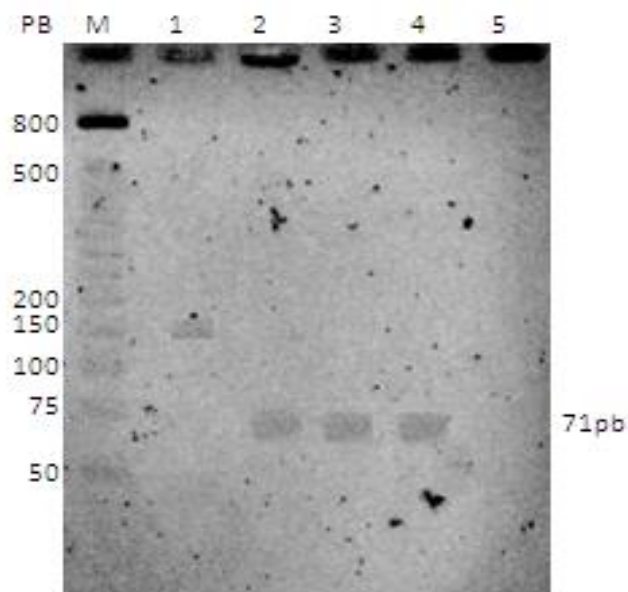


Figura 17. Amplificación de la región GP5/GP6 del VPH 54 mediante PCR-RFLP con enzimas de digestión DdeI + AluI.

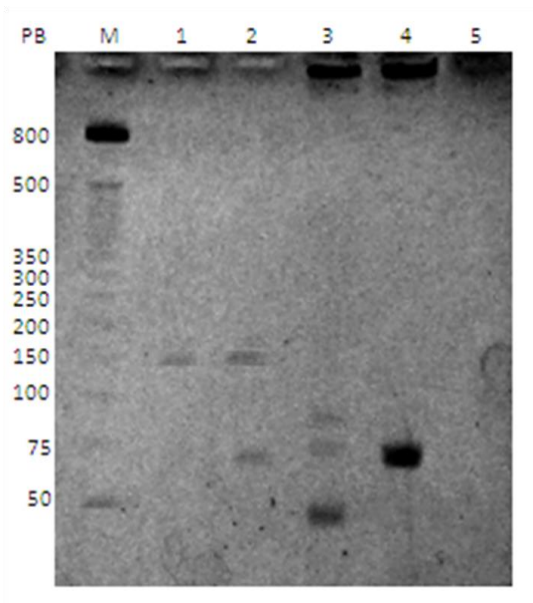


Figura 18. Amplificación de la región GP5/GP6 del VPH 53 mediante PCR-RFLP con la enzima de digestión HpyCH4V y RsaI.

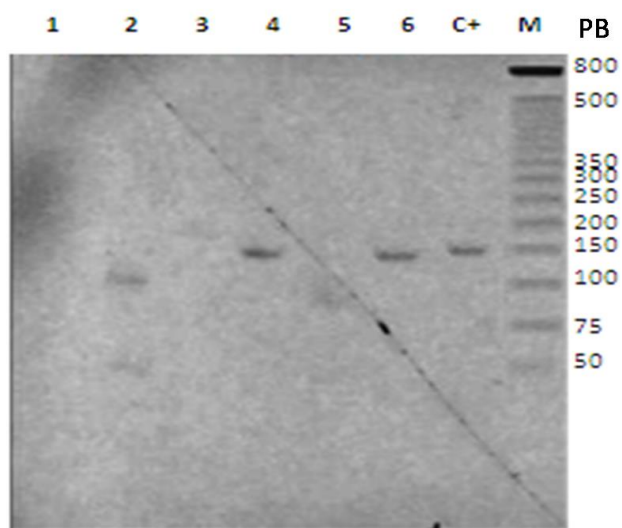


Figura 19. Amplificación de la región GP5/GP6 de los VPH 18, 33, 39, 45 y 52 (pozos 2, 3, 4, 5 y 6) mediante PCR-RFLP con la enzima de digestión HpyCH4V. pozo 1: control negativo.

Discusión

En las últimas décadas, estudios epidemiológicos indican claramente que la infección por VPH es la causa principal del cáncer cervical. Por consiguiente, el virus de papiloma humano se ha considerado como el agente principal asociado a este tipo de neoplasias del tipo intraepitelial tanto benignas como en el caso de las verrugas y malignas como en el caso del cáncer cervical (Correnti *et al.*, 2010). La incidencia de cáncer cervical ha sido cada vez menor en países que han tenido gran cantidad de recursos debido a la a la introducción de los programas nacionales de detección de cáncer de cuello uterino. Por el contrario, en países de bajos recursos y latinoamericanos, debido a la falta de programas de cribado, el cáncer de cuello uterino sigue siendo un problema de salud pública grave posicionándose como uno de los primeros cánceres que están presentes en las mujeres (Ghittoni *et al.*, 2015). En consecuencia de esto, se ha producido una fuerte motivación para la realización de las pruebas de VPH hacia una optimización y estandarización de los métodos de biología molecular que actúan directamente con el estudio del ADN del VPH en pacientes que presentan dichas lesiones (Correnti *et al.*, 2010). La amplia variación de los tipos de VPH y la existencia de múltiples infecciones debidas al virus requiere de métodos fiables para su detección y tipificación.

Las técnicas moleculares más comúnmente usadas para la detección del VPH son las de hibridación del ADN del virus que permite igualmente diferenciar sus diferentes tipos y la técnica de PCR que amplifica el ADN viral. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) amplifica millones de veces la región del genoma viral del ADN diana que se quiere estudiar, en este caso, la región altamente conservada L1 de la cápside viral, mediante ciclos sucesivos de desnaturalización, anclaje y extensión, con oligonucleótidos iniciadores específicos hasta obtener una señal fácilmente visible en geles de agarosa o poliacrilamida teñidos con bromuro de etidio (Ball, 1998 y Quintero *et al.*, 2008). En la PCR se utilizan los oligonucleótidos degenerados MY09/MY11 que abarcan un amplio rango de amplificación del ADN de VPH y cuya sensibilidad es menor en comparación con los oligonucleótidos específicos GP5/GP6 los cuales son complementarios con los anteriores y tienen un rango más específico de amplificación para una mayor sensibilidad anclando en el ADN diana previamente amplificados con los oligonucleótidos MY09/MY11 haciendo la técnica de PCR mucho más sensible que las técnicas de PCR convencionales llamando a esta técnica PCR-nested. Estudios previos han demostrado que el uso de pares de oligonucleótidos como MY09/MY11 y GP5/GP6 en una PCR-nested incrementa la sensibilidad de detección de VPH comparado con la PCR convencional (Coser *et al.*, 2011). Estos estudios afinan la confiabilidad de la técnica ya que sus resultados también indican una alta sensibilidad de la misma comparada con la PCR convencional.

En consecuencia de las técnicas moleculares para la detección del ADN del VPH, el paso determinante es la tipificación del virus cuya importancia es de gran relevancia para conocer los diferentes tipos existentes en una población y de esa manera desarrollar programas de prevención y tratamiento para esa enfermedad (Blanco, 2011) y así disminuir la incidencia y mortalidad de

pacientes con lesiones oncogénicas como en el caso de las pacientes que presentan cáncer cervical, como ocurre en los países desarrollados.

En este estudio la sensibilidad de la técnica PCR-nested fue optimizada de manera progresiva ya que el segundo par de oligonucleótidos complementarios con MY09/MY11 utilizados fueron los PG5/GP6 a diferencia de otros estudios donde los oligonucleótidos complementarios fueron GP5⁺/GP6⁺, por lo tanto para la detección de cada uno de los VPH en estudio se disminuyó la cantidad de ADN aplicada dando como resultados positivos solamente la detección de los tipos de VPH de alto riesgo más comunes, los cuales no pierden fácilmente la integridad a la célula huésped al momento de la infección.

Debido a las grandes diferencias en los tipos de VPH, es importante detectar tanto la infección producida por el virus como cada uno de los tipos presentes en las muestras en estudio, de una manera simple, rápida y a un bajo costo, para ello se utiliza una PCR-RFLP para la identificación de los diferentes tipos de VPH anteriormente detectados (Nobre *et al.*, 2008).

Alineamiento de las secuencias del gen L1 DE VPH con los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5/GP6.

Para el estudio de las secuencias de VPH que amplifican un fragmento del gen L1 altamente conservado de la cápside del virus se escogieron 17 secuencias de los tipos virales de alto y bajo riesgo más comunes en el estado Mérida- Venezuela. A estas secuencias se les realizó un alineamiento junto con los oligonucleótidos degenerados MY09/MY11 los cuales anclan directamente en 450pb de cada una de las secuencias alineadas para cada tipo de VPH en regiones muy similares para determinar una zona altamente conservada de ese gen en particular, el alineamiento se realizó mediante el programa BioEdit sequence alignment versión 7.0.0 2004. Los oligonucleótidos GP5/GP6 se alinearon con las mismas secuencias de cada uno de los VPH antes mencionados con un tamaño de 140pb (ver figuras 9 y 10) determinando así que estos virus de papiloma humano también tienen una alta homología ya que todos están en el mismo orden en el árbol filogenético.

Estandarización de la PCR MY09/ MY11 y PCR-Nested GP5/GP6

Para conocer si el ADN era el adecuado para la realización de la estandarización de la PCR MY09/MY11 y PCR nested GP5/GP6 las muestras clínicas seleccionadas se sometieron a PCR mediante los oligonucleótidos PC04/GH20 los cuales amplifican un fragmento del gen de la β globina demostrando que las muestras tenían las condiciones necesarias adecuadas para la obtención de resultados verificables de mayor confiabilidad. Solamente aquellas que generaron un amplificado para Beta-Globina, fueron las utilizadas en este estudio.

Las muestras que fueron amplificadas con los oligonucleótidos MY09/MY11 resultaron positivas para las muestras que también fueron positivas en una primera amplificación para el gen de la β globina (ver figura 11). Para los oligonucleótidos MY09/MY11 los resultados de las amplificaciones fueron de 450pb mientras que para PC04/GH20 las amplificaciones fueron de 268pb respectivamente. En el caso de las muestras que solamente amplificaron con los oligonucleótidos MY09/MY11 solo resultaron positivos los VPH para los tipos de alto riesgo ya que para estas muestras se utilizó una taq polimerasa que era inestable para algunas reacciones, dando como resultado fragmentos no amplificados y, por lo tanto, negativos como se observa en la figura 12 con los VPH 39, 45, 54, 59 y 66. Mientras que en la figura 13 la mayoría de las muestras amplificadas dieron resultados positivos para MY09/MY11.

Para el caso de las muestras de plásmidos que fueron positivas para los oligonucleótidos GP5/GP6, se observó que en una primera amplificación los resultados dieron bandas muy nítidas en el caso de las diluciones 1/10 (ver figura 14) comparadas con las diluciones 1/100 de cada una de las muestras, donde se obtuvieron resultados negativos para los VPH11, 16, y 31 de esta última dilución, mientras que en las muestras de amplificaciones posteriores como en el caso de las figuras 15 y 16, la amplificación fue positiva solamente para el VPH 53, descartándose los VPH 31, 33, 39 y 45.

Estandarización de la RFLP de los amplificadores GP5/GP6.

Debido a la extensa variación en las enzimas de restricción para tipificación del virus se han comparado análisis teóricos bioinformáticos. Se utilizaron herramientas bioinformáticas para evaluar si la metodología basada en la técnica PCR-RFLP con enzimas de restricción como HpyCH4V, Ddel y RsaI permite la tipificación de todos los tipos de VPH. La bioinformática tiene como resultado confirmar que cada tipo de VPH tenga cortes específicos para cada uno de ellos que no son compartidos por otros tipos de VPH y podrían ser claramente identificados visualizándolos directamente en geles de poliacrilamida. La PCR-RFLP no permite una identificación única para cada uno de los VPH estudiados ya que algunos tienen un mismo patrón y por lo tanto son difíciles de distinguir entre cada uno de ellos, para ello se usan dos o más enzimas de restricción que tengan cortes más específicos para cada tipo de VPH estudiado. Este estudio se centra en usar herramientas bioinformáticas para analizar 17 tipos de VPH de mucosa generando una genotipificación mediante algoritmos según los patrones de digestión con las enzimas de digestión anteriormente mencionadas.

Al realizar el análisis de la digestión virtual con el programa Nebcutter, se observó que en las secuencias analizadas en el gel del VPH 53 se obtuvieron patrones de digestión para cada uno de las muestras del VPH estudiado similares a los esperados en la digestión virtual (ver figura 16). En la figura 17 se observan bandas de ADN con digestión parcial para cada muestra del VPH 54 donde según el algoritmo se deberían visualizar dos bandas separadas de 71 y 68 y según la digestión virtual las bandas deberían ser de 83 y 77 pb respectivamente. En este resultado igualmente las bandas visualizadas se diferenciaron solamente por uno o dos pares de bases en comparación con el algoritmo aplicado y dada la digestión virtual solo hubo diferencia de máximo 9 pares de bases, cabe destacar que la digestión con las enzimas de restricción aplicadas siguen los lineamientos del algoritmo esperados. En la figura 18 se observan los cortes de las bandas de ADN esperados con las enzimas de restricción HpyCH4V y RsaI según el algoritmo aplicado para VPH 53, en el caso de la enzima HpyCH4V la visualización de la banda fue exactamente como el esperado en el algoritmo, mientras que con la enzima RsaI los patrones de las dos primeras bandas de ADN se visualizaron en pares de bases más grandes de lo esperado a diferencia de la última banda cuyo corte fue exactamente igual al esperado en el algoritmo, igualmente el patrón de digestión cumple exactamente con los 3 cortes para la diferenciación del VPH 53 de los demás tipos de VPH. En la figura 19 se observa el patrón de digestión aplicado con la enzima HpyCH4V las bandas de ADN tipificadas de los VPH 18 y 39 se pueden visualizar de una manera más fácil que las bandas de ADN de los VPH 39 y 52, en el caso de la banda de ADN del VPH 45 a pesar de que su visualización es muy tenue tiene un fragmento de menor tamaño al esperado con el algoritmo, este gel de poliacrilamida da como resultado la difícil tipificación para cada uno de los fragmentos de VPH digeridos con esta enzima en geles con diferente composición química como en el caso de la agarosa. Por lo tanto, el uso de un algoritmo es de suma importancia para la diferenciación de cada uno de los tipos de VPH que se requieren para estudios a nivel

molecular. La mayoría de estos patrones son fácilmente visibles usando un sistema de visualización óptimo como es el gel de poliacrilamida 6%. Las enzimas de restricción son altamente eficientes en el caso de diferenciar los fragmentos digeridos en este estudio pero presenta en algunos casos digestión parcial de los fragmentos como ocurrió con VPH 54.

www.bdigital.ula.ve

Conclusiones

La técnica PCR nested tiene una mayor eficiencia de detección de diferentes tipos de VPH en pacientes que tiene poca carga viral en comparación con la PCR convencional debido a su alta sensibilidad ya que permite detectar un gran número de tipos de VPH, incluso VPH desconocidos, en comparación con la PCR convencional.

Con la aplicación de la técnica PCR-RFLP anidada MY09/MY11 con GP5/GP6 la cual es de muy alta sensibilidad, se pudo detectar la presencia del virus en muestras de pobre calidad, que provienen de pacientes con baja carga viral, o con baja producción de virus mayormente en el caso de los VPH oncogénicos debido a su inserción en el genoma obteniendo una mayor resolución de los fragmentos amplificados en una matriz de poliacrilamida donde la visualización es más nítida que los geles de agarosa utilizados en trabajos anteriores.

La aplicación de un algoritmo de digestión con enzimas de restricción permite identificar de manera más eficiente, junto con la digestión virtual realizada por un programa de bioinformática, cada uno de los fragmentos digeridos del ADN amplificado con cada una de las enzimas de restricción cuyos cortes son específicos para cada tipo de VPH en particular, pudiéndose identificar incluso aquellos tipos de VPH donde los cortes con enzimas de restricción son muy similares en sí y por lo tanto su difícil identificación conlleva a digestiones posteriores siguiendo los alineamientos de dicho algoritmo.

www.bdigital.ula.ve

Recomendaciones

- Hacer un análisis de la sensibilidad de las diferentes PCR para determinar la concentración óptima del ADN de los VPH utilizados.
- Hacer un alineamiento de una mayor cantidad de varios tipos de VPH para aumentar el grado de homología entre cada uno de ellos.

www.bdigital.ula.ve

Bibliografía

- Arapé, N *et al.* (2006) Uso del polimorfismo de fragmento de restricción en el sistema GP5+/GP6+ para la detección de VPH. Universidad de Los Andes. Facultad de Odontología.
- Arroyo, j. (2015) “Detección e identificación de los virus del papiloma humano. Caracterización de dos nuevas variantes”. Univ. Aut. Barc. Facultad de Ciencias. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- Avsi, A. (2012). Genomic organization and proteins of human papillomavirus. NCBI. Pub. Med: 22951665.
- Ball, E. (1998). Virus papiloma humano. Biología molecular, genética y mecanismo oncogénico. Parte I. Derm. Ven.VOL. 36, N° 4.
- Bansal, A. Singh, M. Rai, B. (2016).Human papillomavirus- associated cancer: A growing global problem. Int J Appl Basic Med Res. Vol 6. Num 2. Pp 77-148.
- Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa L, Delius H, et al.(1994).Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphism, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. J Infect Dis. Pp170–85.
- Blanco, N. (2011). Estandarización del sistema PCR-RFLP-HpyCH4V de la región LCR-E6 para la detección y tipificación del VPH en muestras de pacientes con lesiones intraepiteliales de alto grado.Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX). Universidad de Los Andes.
- Chan, S. Delius, H. Halpern, A. Bernard, H. (1995). Analysis of Genomic Sequences of 95 Papillomavirus Types: Uniting Typing, Phylogeny, and Taxonomy. Jour. Vir. Vol. 69, No. 5. Pp 3074–3083.
- Coser, J *et al.* (2011). Human papillomavirus detection and typing using a nested-PCR-RFLP assay. Braz J Infect Dis vol.15 no.5
- Cruz, J. (2015). Diseño y producción de un péptido multi-epítotope L1 para la detección de anticuerpos anti-VPH16 en sueros de pacientes con infección por VPH. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX). Universidad de Los Andes.
- David, Newton. Sexual health: A reference of handbook.2010.ABC-CLIO,LLI. pp 151-152

- De Villiers E., Fauquet C., Broker T., Bernard H. zurHausen H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.
- Fernández, L. (2009). Clonamiento y Secuenciamiento parcial del gen L1 de los papiloma virus (VPH) más frecuentes en la población de Mérida Venezuela. Trabajo final de grado. Facultad de Ciencias. ULA.
- Fonseca, A. Silva, R. Miranda, A. Ferreira, L. Chen, Z. (2016). Comparison of Three Human Papillomavirus DNA Detection Methods: Next Generation Sequencing, Multiplex-PCR and Nested-PCR Followed by Sanger Based Sequencing. *Jour. Med. Vir.* 88:Pp 888–894
- Garnica, F. (2011). Utilidad de la PCR para la detección del virus de papiloma humano en pacientes con citología ASC-US. *Univ. Pont.Jav. Bogota*,
- Ghittoni, R. Accardi, R. Chiocca, S. Tommasino, M. (2015). Role of human papillomaviruses in carcinogenesis. *E cancer.* vol9:526
- Gómez, M; Drut, R. (1995) Detección del virus del papiloma humano en la papilomatosis laríngea juvenil mediante reacción en cadena de la polimerasa. *Rev. Med Vol. 55, N. ° 3.* Pp 213-217.
- Hernandez, E. Betancourt, A. Soberon, M. (2004). Cellular and viral elements involved in the replication of human papilloma virus. *RevOncol.vol6(5)Pp:263-71*
- Hernández, D. Cruz, J. Quintero, M. Bastidas, M. Puig, J. (2012). Diseño de un sistema de PCR para la detección del virus del papiloma humano mediante el uso de oligonucleótidos degenerados de la región E6. *Rev. Obstet. Ginecol. Ven. Vol.72 no.4.*
- Husman, A. Walboomers, J. van den Brule, J. Meijer, C. Snijders, p. (1995). The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *Jour. Gen. Vir. Vol 76.* Pp 1057-1062.
- Kumar, P. Murphy, F. (2013). Francis Peyton Rous. *Emerging Infectious Diseases* • www.cdc.gov/eid • Vol. 19, No. 4.
- León, G; Bosques, O. (2005) Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino. *Rev. Cub. Obstet. Ginecol. v.31 n.1 Ciudad de la Habana.*

- Lorenzato, F. Singer, A. Mould, T. (2001).cervical cancer detection by hybrid capture and evaluation of local risk factors. Int. Jour. Gynec. Obst. Num 73. Pp 41-46.
- Lorenzi, A. Syrjänen, K. Longatto, A. (2015). Human papillomavirus (HPV) screening and cervical cancer burden. A Brazilian perspective. Jour. Vir. Num 12. Pp 112.
- Lleonart, M.E; Sánchez, R. (1997). Técnicas de hibridación, clonación y secuenciación de ácidos nucleicos en el diagnóstico anatomo patológico. Rev. Esp. Patol. Vol 30. Num 3.
- Maniatis, T. Sambrook, J. (2001).Molecular cloning. A laboratory manual. Harbor laboratory, Vol 3, second edition. Pp A.6
- Medina, L. Medina, M. Merino, L. (2012) Valoración diagnóstica de técnicas moleculares para detección de infección bucal por virus del papiloma humano. Rev. Cost. Sal. Púb.Vol 21, Num 2, pp 2.
- Morcillo, G; Rubio, E. Cortés, E. (2013) Biotecnología y alimentación. Editorial UNED.Pp 307, 308, 312,315.
- Mullis, k. Faloona, F.(1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology 155: 335-350
- Mullis, k. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. Sci. Am. 262:56-65.
- Münger, K. Scheffner, M. Huibregtse, M. Howley, P.(1992). Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products.NCBI.pubmed:1322242.
- Nakahara, T, et al.(2002). Modulation of the cell division cycle by Human Papillomavirus type 18 E4.Jour. Vir. Vol. 76. Num 21.
- Nobre, R. Almeida, L. Martins, T. (2008). Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. Jour. Clin. Vir. Vol 42. Pp 13-21.
- Olivera, R. Rosado, J. Sánchez, A. Mendoza, I. Castellano, A. Dorantes, G. Pérez, P. (2006). Epidermodisplasia verruciforme. Modelo de carcinogénesis viral. Derm. Rev. Mex. Vol 50. Num 3. Pp83-86.

- Pett, M. Herdman, T. Palmer, R y col. (2006). Selection of cervical keratino-cytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. Proc. Nat. Acad. Sci. Vol103. Num 10
- Quintero, M; Cruz, J. Bastidas, M. Márquez, L. Puig, J. (2008) .Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP.Rev.Obstet.Ginecol.Venez.vol.68 n.1.
- Quiñones, W; Pérez, S. (2003) Virus del papiloma humano. Actualización y presentación de un caso de carcinoma esofágico asociado a VPH. Rev. Mex Patol Clin, Vol. 50, Núm. 1, pp 13,15.
- Qu, w; Jiang, G. Cruz Y., Chang C. J., Ho G. Y., Klein R. S., Burk R. D.(1997) PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer system. Jour. Clin. Micro. Vol. 35, No. 6 p. 1304–1310.
- Reigosa, A. Fernández, A. Hung, C. *et al.* (2015). Genotipos del virus papiloma humano en el cuello uterino de mujeres de la región central de Venezuela. Rev Obs. Gin. Ven. Num. 75 vol. 3. Pp :177-186.
- Rodríguez, R; Gonzales, C. Ayala, L. Rocha, J. García, V. Espinoza, T. (2009) Detección de microorganismos mediante métodos moleculares. Rev. Div. Cientif. Num. 1.
- Solidoro, A. (2006).Cáncer en el Siglo XXI. Acta med. Per. Vol 23. Num 2.
- www.who.int/mediacentre/factsheets/Fs297/es/
- Globocan.iarc.fr/factsheets/populations/factsheet.asp?uno=90
- Villalobos, A; Guerra, V. Vidal, M. *et al.* (2009).Virus del papiloma humano y lesiones papulosas de esófago.Rev.Gen.Vol.63 n.4.