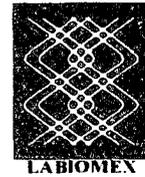




Universidad de Los Andes
Consejo de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias
Laboratorio de Biología y Medicina Experimental LABIOMEX



CB 400
22

Estandarización de un Sistema PCR-SSCP de la región GP5+/GP6+ del gen *L1* para la Detección y Tipificación de los de los 17 tipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) más comunes en el estado Mérida- Venezuela.

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad de Los Andes por la
Licenciada **Raibel Janis Suárez Useche**
como requisito para optar al título de **Magister Scientiae en Biología Molecular**

DONACION

SERBIULA
Tullio Febres Cordero

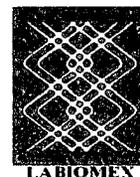
Tutor: MSc. Jhon F. Cruz Gómez

Mérida, 2012.

www.bdigital.ula.ve
A mi Familia...



Universidad de Los Andes
Consejo de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias
Laboratorio de Biología y Medicina Experimental LABIOMEX



GP 400
22

Estandarización de un Sistema PCR-SSCP de la región GP5+/GP6+ del gen *L1* para la Detección y Tipificación de los de los 17 tipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) más comunes en el estado Mérida- Venezuela.

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad de Los Andes por la
Licenciada **Raibel Janis Suárez Useche**
como requisito para optar al título de **Magister Scientiae en Biología Molecular**

DONACION

SERBIULA
Tulio Febres Cordero

Tutor: MSc. Jhon F. Cruz Gómez

Mérida, 2012.

www.bdigital.ula.ve
A mi Familia...

AGRADECIMIENTOS

A Dios Todopoderoso, a la Virgen de la Consolación y al Santo Cristo por iluminarme y guiarme por el camino correcto.

A mis Padres Maribel y Artidoro, por darme la vida y ayudarme de manera incondicional, este triunfo es de ustedes.

A mi hermana, por ser mi amiga y estar ahí en todos los momentos y hacerme sentir más orgullosa y feliz cada día.

A mi tía Nancy, por apoyarme y tenderme su mano amiga siempre y darme sabios consejos que me han ayudado tanto en mi vida profesional como personal.

A Neudo, por estar ahí siempre, apoyándome, ayudándome, abrazándome y secando mis lágrimas, gracias mi lindo, Te amo.

Al Profesor Juan Puig por abrirme las puertas de su laboratorio, ayudarme y permitirme ser parte de esa hermosa familia LABIOMEX.

A mi tutor, el profesor Jhon Cruz por ayudarme a entender el mundo de la biología molecular y apoyarme desde el primer día que entré en el laboratorio.

Al profesor Marco Bastidas, por hacerme sonreír todos los días y enseñarme muchas cosas maravillosas... *“Domo arigato gosai mas”*.

A la profe Militza Quintero, por ayudarme con grandes o pequeños detalles que siempre marcaron la diferencia de manera positiva.

A Juliana, por ayudarme en todos los momentos, especialmente en los más difíciles. ¡Gracias vecina!

A Lisbeth, por acompañarme en todos los momentos a lo largo de estos tres años y decirme todos los días: Todo va a salir bien. Gracias Amiga.

A Marisé y Danmarys por ayudarme y apoyarme siempre en especial cuando el camino se hacía estrecho.

A todos los compañeros que forman parte de la gran familia LABIOMEX: Natasha, Nol, Soumi, Maricef, Alejandra, Liliana, Lusmary, Rossana, Balbino, Reinaldo, Ramón, Carlos, Rubén y Arévalo. Gracias a todos por sus buenos consejos y ayuda incondicional.

A todas aquellas personas que me ayudaron a cumplir este sueño, es especial a: Sra. Dorita, Sra. Eucaris, Lilibeth y Zuly.

Gracias a todos por ayudarme, Dios se los pague.

INDICE GENERAL

	Página
Dedicatoria.....	ii
Agradecimientos.....	iii
Resumen.....	xiv
Marco Teórico.....	1
Epidemiología del Virus de Papiloma Humano.....	1
Organización Molecular y Bioquímica de VPH.....	5
Proteína E1.....	9
Proteína E2.....	10
Proteína E4.....	11
Proteína E5.....	11
Proteína E6.....	12
Proteína E7.....	13
Proteína L2.....	14
Proteína L1.....	15
Estructura del Virus de Papiloma Humano.....	17
Clasificación Taxonómica de VPH.....	19
Ciclo de Vida de VPH.....	24
Métodos de Detección para VPH.....	37

Planteamiento del Problema.....	40
Hipótesis.....	41
Objetivo General.....	42
Objetivos Específicos.....	42
Materiales y Métodos.....	43
Extracción de ADN.....	43
Cuantificación de ADN.....	45
Evaluación de la integridad del ADN plasmídico.....	46
Evaluación de la calidad e integridad de las muestras.....	47
Observación de los amplificados y digestiones.....	48
Sistema PCR-SSCP.....	48
PCR-RFLP para las muestras con patrones diferentes.....	51
Reacción de Secuenciamiento.....	51
Resultados.....	53
Cuantificación de la concentración de ADN.....	53
Evaluación de la integridad del ADN plasmídico.....	53
Confirmación de la identidad de los tipos virales.....	53
Evaluación de la calidad e integridad del ADN de las muestras.....	54
Polimorfismo de cadena sencilla SSCP.....	57

VPH Tipo 6.....	57
VPH Tipo 11.....	59
VPH Tipo 16.....	60
VPH Tipo 18.....	62
VPH Tipo 31.....	64
VPH Tipo 33.....	65
VPH Tipo 39.....	65
VPH Tipo 45.....	66
VPH Tipo 52.....	66
VPH Tipo 53.....	67
VPH Tipo 54.....	68
VPH Tipo 56.....	68
VPH Tipo 58.....	69
VPH Tipo 59.....	69
VPH Tipo 66.....	70
VPH Tipo 70.....	71
VPH Tipo 81.....	71
Evaluación de las Variables.....	73
Secuenciamiento.....	75

Secuencia 4110.....	76
Secuencia 4125.....	77
Secuencia 4258.....	78
Evaluación de Pacientes.....	80
Discusión.....	82
Conclusiones.....	87
Recomendaciones.....	88
Referencias Bibliográficas.....	89

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Genoma de VPH tipo 16.....	7
Figura 2: Estructura del genoma y mapa de transcripción de VPH 16.....	8
Figura 3: Estructura de cristal del pentámero de L1 de VPH 16.....	16
Figura 4: Estructura atómica de proteína de L1 de VPH 16.....	18
Figura 5: Árbol filogenético de las secuencias de 118 tipos de VPH.....	20
Figura 6: Vías de endocitosis de VPH.....	28
Figura 7: Eventos tras la infección por VPH.....	33
Figura 8: Efecto de E2 sobre E6 y E7.....	34
Figura 9: Amplificados de la región MY09/MY11 de los 17 tipos virales.....	53
Figura 10: RFLP de los tipos virales presentes en el ADN plasmídico.....	54
Figura 11: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 6.....	54
Figura 12: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 11.....	55
Figura 13: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 16.....	55
Figura 14: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 18.....	55
Figura 15: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 31 y 33.....	55
Figura 16: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 39 y 45.....	56
Figura 17: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 52 y 53.....	56
Figura 18: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 54, 56 y 58.....	56

Figura 19: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 59 y 66.....	56
Figura 20: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 70 y 81.....	57
Figura 21: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 6.....	57
Figura 22: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 6.....	58
Figura 23: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 6.....	58
Figura 24: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 11.....	59
Figura 25: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 11.....	59
Figura 26: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 16.....	60
Figura 27: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 16.....	61
Figura 28: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 16.....	61
Figura 29: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 18.....	62
Figura 30: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 18.....	62
Figura 31: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 18.....	63
Figura 32: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 31.....	64
Figura 33: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 31.....	64
Figura 34: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 33.....	65
Figura 35: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 39.....	65
Figura 36: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 45.....	66
Figura 37: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 52.....	66

Figura 38: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 52.....	67
Figura 39: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 53.....	67
Figura 40: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 54.....	68
Figura 41: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 56.....	68
Figura 42: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 58.....	69
Figura 43: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 59.....	69
Figura 44: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 66.....	70
Figura 45: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 66.....	70
Figura 46: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 70.....	71
Figura 47: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 81.....	71
Figura 48: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45 y 52.....	72
Figura 49: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 54, 56, 58, 59, 66, 70 y 81.....	72
Figura 50: Amplificado GP5+/MY09 para las variables.....	73
Figura 51: RFLP de las variables amplificadas.....	74
Figura 52: Amplificados de la región GP5+/GP6+ de las muestras 4110, 4125 y 4258.....	75
Figura 53: Alineamiento mediante CLUSTALW2 de la muestra 4110.....	76
Figura 54: Sustitución de base en la muestra 4110.....	76

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1: Distribución de la incidencia de casos y muertes por cáncer cervical para 2002.....	3
Tabla 2: Muertes por tumor maligno de cuello uterino registrada por grupos de edad para 2008.....	4
Tabla 3: Clasificación de géneros y especies de VPH.....	22
Tabla 4: Agrupamiento de especies y tipos de VPH.....	23
Tabla 5: Oligonucleótidos utilizados en esta investigación.....	46
Tabla 6: Componentes de la reacción de digestión.....	47
Tabla 7: Componentes de la mezcla de reacción para GP5+/GP6+.....	48
Tabla 8: Componentes de la mezcla de gel de poliacrilamida al 6%.....	48
Tabla 9: Componentes de la mezcla de gel de poliacrilamida al 12%.....	49
Tabla 10: Componentes de la mezcla de reacción para secuenciamiento.....	52
Tabla 11: Clasificación de las muestras de acuerdo al patrón de SSCP.....	73
Tabla 12: Secuencia de las muestras.....	75

INDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1: Tasa de Mortalidad debido a cáncer de cuello uterino.....	5

www.bdigital.ula.ve

INDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1: Tasa de Mortalidad debido a cáncer de cuello uterino.....	5

www.bdigital.ula.ve

RESUMEN

El cáncer cervical es una de las neoplasias que afecta los órganos reproductivos de la mujer y el Virus de Papiloma Humano (VPH) es su agente causal. Uno de los métodos para la detección del virus es la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir del marco de lectura del gen *L1*, mediante los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5+/GP6+ y la reacción anidada que aumenta su sensibilidad, pero, la longitud del amplificado GP5+/GP6+ es de 150 bp, e impide el uso de enzimas de restricción para su tipificación, por ello se estandarizó un sistema de PCR-SSCP de la región GP5+/GP6+ para aplicarlo como sistema diagnóstico de rutina para la tipificación viral, seleccionando muestras de pacientes diagnosticados con uno de los 17 tipos virales, se amplificó la región GP5+/GP6+ a partir del amplificado MY09/MY11 y se sometieron a SSCP para evaluar los patrones de movilidad electroforética, posteriormente se secuenciaron aquellas muestras con patrones diferentes. Se concluyó que los patrones migratorios de cada tipo viral fue semejante aunque difirieron entre los diversos tipos, lo que indicó que la región GP5+/GP6+ es altamente conservada para cada tipo viral.

Palabras Claves: Virus de Papiloma Humano, oligonucleótidos GP5+/GP6+, PCR-SSCP,

MARCO TEÓRICO

- **Epidemiología del Virus de Papiloma Humano**

El cáncer cervical es una de las neoplasias más comunes que afecta los órganos reproductivos de la mujer. Mundialmente es el segundo cáncer más frecuente después del de mama, y en los países desarrollados es la primera causa de muerte en mujeres (WHO, 2010) (Abdul y col., 2009).

Las hipótesis para tratar de establecer la relación entre las infecciones por papilomavirus y cáncer cervical iniciaron en 1972 a partir de la evaluación de la conversión de verrugas genitales en carcinomas escamosos y fueron confirmadas en 1976 cuando se estableció que las células coilocíticas encontradas en pacientes con lesiones displásicas eran producto del efecto citopático por la infección por papilomavirus (zur Hausen, 2009). En 1995, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC) concluyó que existía suficiente evidencia de la capacidad carcinogénica de los Virus de Papiloma Humano (VPH) 16 y 18 (Muñoz y col., 2006); desde entonces hasta ahora, se han realizado numerosos estudios con evidencia histológica que relacionan el riesgo de padecer cáncer de con otros tipos de VPH y se ha definido que aproximadamente 15 tipos causan virtualmente todos los cánceres cervicales de los 35 tipos que infectan la mucosa genital humana (Muñoz y col., 2006) (Schiffman y col., 2003) (WHO, 2010). Actualmente se sabe que los tipos mayormente asociados con cáncer cervical invasivo son los 16 y 18, los cuales son responsables del 70% de los cánceres a nivel mundial, seguidos de 31, 33, 35, 45, 52 y 58 (WHO, 2008) (WHO, 2010).

Por su parte, el VPH se asocia con más del 99% de los cánceres cervicales así como con un importante número de malignidades anogenitales y orofaríngeas que afectan tanto a hombres como a mujeres produciendo cáncer de pene, ano, vulva/vagina, orofaríngeo y orales (WHO, 2007) (WHO, 2010). Sin embargo, si bien la presencia del virus es necesaria para la aparición de cáncer cervical no es suficiente para el desarrollo del mismo debido a que muchas infecciones son superadas por el sistema inmune en dos años; diversos estudios

han demostrado que se necesitan otros factores para la persistencia y desarrollo de cáncer, entre ellos se incluyen multiparidad, hábito de fumar, uso prolongado de anticonceptivos orales, deficiencias nutricionales, factores genéticos y otras infecciones de transmisión sexual como Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (WHO, 2008) (PAHO, 2008).

VPH es la infección sexual de tipo viral más común y se estima que más del 75% de la población sexualmente activa es infectada con el mismo en algún momento de la vida; se ha reportado que en la población general, la prevalencia de VPH por edad es superior en mujeres con edad comprendida entre 15 y 24 años (20-30%) y disminuye a medida que se acerca a los 50 años y luego de esa edad la prevalencia vuelve a aumentar hasta aproximadamente 20%, este patrón se conserva tanto para los tipos de alto como de bajo riesgo (PAHO, 2008) (WHO, 2010).

La distribución de los tipos de VPH varía entre regiones, pero el tipo oncogénico dominante en todas las regiones es el 16 mientras que la infección con tipos de bajo riesgo como 6 y 11 raramente producen cáncer, pero pueden causar lesiones benignas como verrugas genitales o condiloma acuminado, papilomatosis respiratoria y lesiones intraepiteliales de bajo grado en las células cervicales que pueden ser indistinguibles mediante citología o análisis histológico de aquellas causadas por tipos de alto riesgo (WHO, 2008) (WHO, 2010).

En 2008 se estimó que existían alrededor 336,5 millones de mujeres con edad superior a 15 años de los cuales 86.000 serían diagnosticadas con cáncer cervical y de ellas 38.000 morirían por la enfermedad anualmente en América, esto significa que la incidencia anual de cáncer es de 18,8 por cada 100.000 mujeres y la mortalidad de 8,1 por cada 100.000 mujeres. (PAHO, 2008). Para 2008 la Agencia Internacional para la Investigación de Cáncer (IARC) publicó la incidencia de casos y muertes por cáncer cervical del 2008 dichos datos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1: Distribución de la incidencia de casos y muertes por cáncer cervical para 2002 (IARC, 2008).

Números estimados (x1000)	Casos	Muertes
Regiones más desarrolladas	76	32
Regiones menos desarrolladas	453	242
Región Africana según la OMS (AFRO)	75	50
Región Americana según la OMS(PAHO)	80	36
Región del Mediterráneo Este según OMS (EMRO)	18	11
Región Europea Según OMS(EURO)	61	28
Región Sureste Africano según OMS (SEARO)	188	102
Región Pacífico Oeste según OMS (WPRO)	105	46
Estados Unidos de América	11	3
China	75	33
India	134	72
Unión Europea (EU-27)	31	13
Mundial	530	275

En el caso de Latinoamérica y el Caribe, para 2008 se concluyó que el cáncer cervical es la cuarta causa más común de cáncer en ambos géneros y la segunda causa más común de cáncer en mujeres con edades entre 15 y 44 años después del cáncer de mama. Entre las mujeres con citología con tinción de Papanicolau (Pap) normal, la prevalencia promedio viral se estimó en 16%, mientras que en mujeres con lesiones cervicales de bajo grado la prevalencia fue de 75,6% y entre las mujeres con lesiones de alto grado la prevalencia fue de 83,9%, por su parte, entre las que presentaban con cáncer cervical se detectó la presencia del virus en el 100% de los casos. La mayoría de los casos ocurre en Brasil, México, Colombia, Perú y Argentina, en total suman 49.000 casos o el 68% del total de casos en la región (PAHO, 2008).

Por su parte, el cáncer en Venezuela es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares con 20,61% y 14,81% respectivamente según el anuario de mortalidad 2008 del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). El porcentaje de muertes por cáncer corresponde a 19.796 pacientes de ambos sexos, de los cuales 9636 fueron femeninas y de este número, 1218 corresponden a mujeres quienes murieron por cáncer de cuello uterino. Asimismo, se mantiene la tendencia mundial en la cual el cáncer de mama es la primera causa de muerte entre las mujeres, ya que para ese mismo año se reportaron 1510 por esta enfermedad, sin embargo, en 2005 el cáncer de cuello uterino se

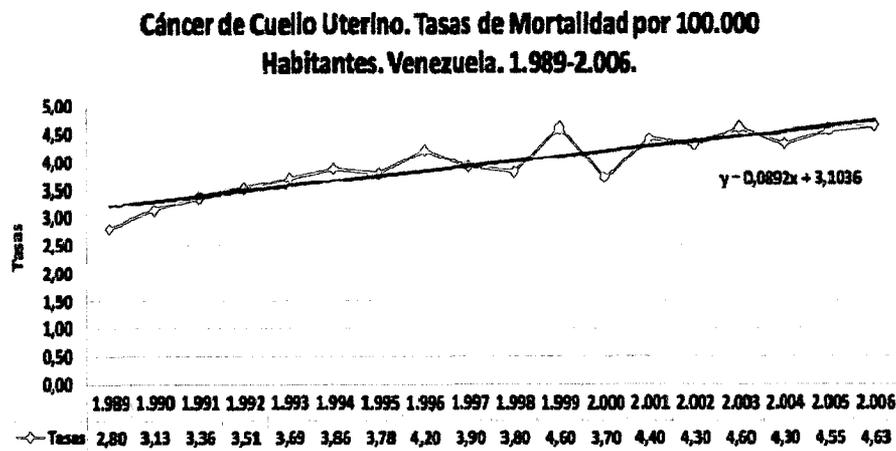
reportó como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres mientras que el cáncer de mama se ubicaba de segunda posición (Anuario de Mortalidad, 2008) (Oletta y col., 2011).

La tendencia de muerte por edad debido al cáncer de cuello uterino se muestra en la Tabla 2 en la que se puede observar que la prevalencia ocurre en edades comprendidas entre los 45 y los 64 años de edad donde se ubican 529 de las muertes, lo que corresponde a 43,43% (Anuario Mortalidad, 2008).

Tabla 2: Muertes por Tumor Maligno de Cuello Uterino registrada por grupos de edad para 2008 (Anuario de Mortalidad, 2008)

Edad (años)	Muertes por Tumor Maligno de Cuello Uterino
20-24	11
25-29	28
30-34	63
35-39	115
40-44	134
45-49	151
50-54	131
55-59	142
60-64	105
65-69	82
70-74	90
75-79	67
80-84	58
+85	41
TOTAL	1.218

De acuerdo a los datos de la Alerta Epidemiológica Nro. 194 de la Red de Sociedades Científicas Médicas Venezolanas en 2011, demuestran que se mantiene una tendencia en ascenso en la tasa de mortalidad por cáncer de cuello uterino por cada cien mil habitantes; dichos datos se calcularon en base a los datos de los anuarios de mortalidad del Ministerio de Salud entre 1989 y 2006 (ver la Gráfica 1), sin embargo, hasta 1985 el cáncer cervical venía presentando una situación de descenso importante, y a partir de este año la tendencia se revirtió y se produjo una curva en hamaca hasta 1995. De igual manera el autor manifiesta que al no disponer de datos recientes se debilita la vigilancia epidemiológica y se dificulta la toma de decisiones en políticas sanitarias, sustentadas en evidencias demostrables (Oletta y col., 2011).



Gráfica 1: Tasa de Mortalidad debido a cáncer de cuello uterino por cada 100.000 habitantes desde 1989 hasta 2006 (Oletta y col., 2011).

De igual manera, en el Anuario de Mortalidad 2008 del MPPS se describe la distribución de casos de acuerdo a la entidad regional y se reportó el mayor número de muertes por cáncer de cuello uterino en el estado Zulia con 140 muertes seguido de los estados: Miranda, Distrito Capital y Carabobo con 104, 103 y 97 muertes respectivamente. Por su parte, en el mismo anuario se reporta que en el estado Mérida hubo 287 muertes de mujeres por tumores malignos de los cuales 25 fueron por cáncer de cuello uterino (Anuario de Mortalidad, 2008).

- **Organización Molecular y Bioquímica de VPH**

El genoma de VPH está compuesto por ácido desoxirribonucleico (ADN) doble banda, circular de aproximadamente 8 kb (Zheng y col., 2006) y comprende 8 marcos abiertos de lectura (Abdul y col., 2009), los cuales se expresan en ARNm policistrónicos a partir de la misma hebra de ADN (Conway y col., 2009) (Wang y col., 2011), los marcos de lectura están divididos en región temprana (Early) y tardía (Later). La región temprana codifica para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 las cuales son necesarias para la replicación del ADN viral, para el ensamblaje de nuevas partículas virales en las células infectadas así como para la desestabilización de los mecanismos reguladores de la célula hospedadora. En la región tardía se codifican las dos proteínas de la cápside L1 y L2 también denominadas

proteínas tardías. La región temprana de papilomavirus ocupa más del 50% del genoma del virus, mientras que la región tardía ocupa un 40% y la región reguladora el 10% restante (Abdul y col., 2009) (Zheng y col., 2006). El genoma de VPH tiene un contenido de G-C del 40% (Forslund y col., 1996).

Ambos grupos de genes están separados por una región reguladora aguas arriba (URR), también conocida como región larga de control (LCR) (Abdul y col., 2009) la cual tiene una longitud que varía entre 650 y 900bp (Ghittoni y col., 2010), ésta no codifica para proteínas pero contiene elementos *cis*-reguladores los cuales son necesarios para la regulación de la expresión génica, replicación del genoma y su empaquetamiento dentro las partículas virales (Herrington, 1994) (Abdul y col., 2009) (Muñoz y col., 2006) así como ser altamente responsable en determinar el rango del hospedero y el tropismo tisular de cada tipo de VPH. Esta región contiene el origen de replicación viral, cuatro sitios de unión de la proteína viral E2 y numerosos sitios de unión de factores de transcripción celular (Abdul y col., 2009).

Los VPH de alto riesgo inician la mayoría de la transcripción a partir de dos promotores: el primero o temprano y el tardío; el temprano inicia aguas arriba del marco abierto de lectura de *E6* y sintetiza los transcritos que son traducidos en la etapa temprana del ciclo de vida del virus; debido a que el mismo funciona de manera independiente de la diferenciación, se puede iniciar previa a la fase productiva del ciclo viral. En VPH 16 el promotor temprano es denominado p97, mientras que en VPH 31 es denominado como p99 y en VPH 18 como p105 (Conway y col. 2009). Este promotor está totalmente controlado, principalmente por elementos *cis* ubicados aguas arribas en el LCR, estos elementos incluyen cuatro sitios consenso para la unión de *E2* (E2-BSs), los cuales son ACC(N₆)GGT, que interactúan con factores de transcripción celular y con el transactivador/represor *E2* y regulan la transcripción del promotor en células basales indiferenciadas hasta los queratinocitos altamente diferenciados; sin embargo, otros estudios realizados en VPH 16 indican que las funciones de *E2* como represor de p97 ocurre cuando el genoma está integrado pero no en la forma episomal (Zheng y col., 2006). Ver Figura 1.

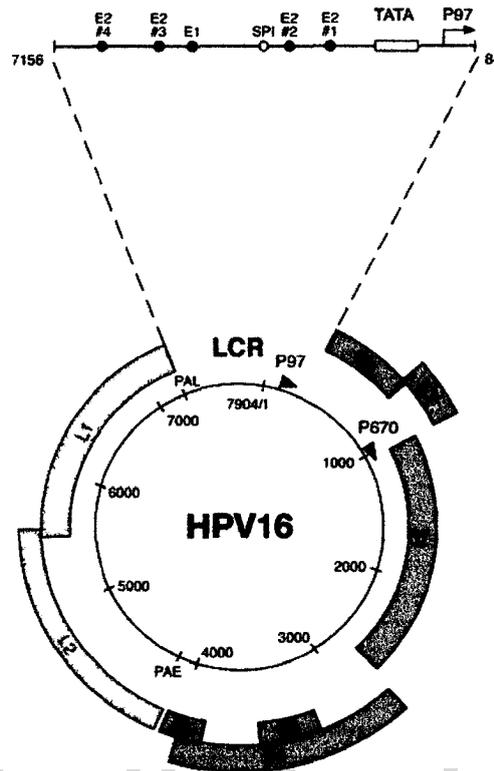


Figura 1: Se señala: el genoma de VPH 16(círculo negro) con los promotores temprano y tardío marcados con flechas, los marcos de lectura en verde, rojo y amarillo, la región larga de control, la cual se ubica entre 7156–7184 y los sitios de unión para E2 así como la caja TATA del promotor p97, así como los sitios de unión para E1 y SP1 (Doorbar, 2006).

El primer resultado de la transcripción de la región temprana que resulta en el pre ARNm consta de tres exones y dos intrones, los cuales sufren un proceso de empalme alternativo (splicing) y una poliadenilación en el nucleótido 4215. Como se muestra en la figura 2 cada intrón de cada transcrito temprano puede ser empalmado a través de la utilización de tres sitios para empalme alternativo 3' en los sitios 409, 526 y 742 en intrón 1 y otros tres empalmes alternativos en los nucleótidos 2582, 2709 y 3358 en intrón 2, conllevando a la producción de por lo menos 14 especies de transcritos de ARNm con diferente potencial codificante (Zheng y col., 2006)

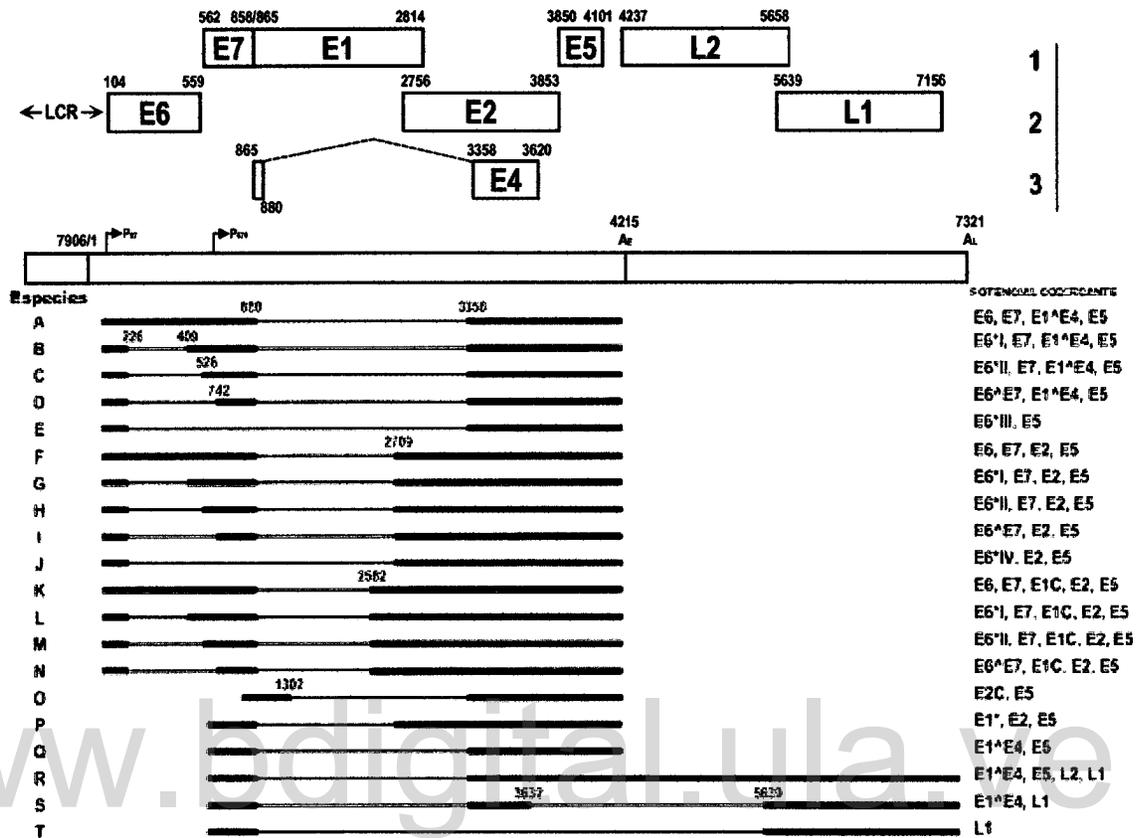


Figura 2. Estructura del genoma y mapa de transcripción de VPH 16. La línea principal del panel representa una forma lineal del genoma viral, promotores (flechas) y sitios de poliadenilación tempranos y tardíos. Los marcos abiertos de lectura (Cajas abiertas) están diagramadas por encima de la línea principal y tienen indicados en su parte superior las posiciones del primer nucleótido del codón de inicio y el último nucleótido del codón de parada. LCR indica una región larga de control. Debajo de la línea de soporte son las especies de RNA informes derivadas de uso alternativo de promotor y splicing alternativo. Exones (líneas pesadas) e intrones (líneas finas) con posiciones de sitio de empalme se numeran por posiciones de nucleótidos en el genoma del virus. (Zheng y col. 2006)

El segundo promotor o promotor tardío, es iniciado de una manera dependiente de diferenciación, y se activa sólo cuando las células del hospedador han crecido y se ubican en el tejido estratificado diferenciado. Una vez activado, el promotor tardío dirige la transcripción de un grupo heterogéneo de sitios de inicio los cuales se ubican alrededor del nucleótido 742 en el caso de VPH 31 (p742), mientras que en VPH 16 se identifica como p670. El promotor tardío sirve específicamente para producir una serie de transcritos que facilitan la traducción de las proteínas L1 y L2 (Conway y col., 2009). La activación del promotor dependiente de diferenciación depende de los cambios en la señalización celular

más que de la amplificación del genoma y conduce al incremento de las proteínas virales necesarias para la replicación (E1, E2, E3 y E5) (Doorbar, 2006).

En el caso de VPH 31, el promotor tardío es regulado por un elemento *cis* localizado en la región codificante de *E6* y *E7*, sin embargo, los promotores tardíos de VPH 16 y 31 están ubicados en la región codificante de *E7* y la transcripción del promotor tardío tiene una derivación en el sitio de poliadenilación que permite la expresión de la región tardía, como resultado, el verdadero pre ARNm es una quimera de regiones tempranas y regiones tardías (Zheng y col, 2006).

- **Proteína E1**

La proteína E1 pesa entre 68 y 70 kDa. Esta proteína E1 es requerida para la replicación viral y es altamente conservada entre todos los tipos de VPH, la misma tiene actividad ATPasa y contiene dos dominios: un dominio de unión al ADN (DBD) y un dominio helicasa 3'-5'; la proteína E1 es expresada a lo largo del ciclo de vida de VPH pero en mayores niveles durante el estadio vegetativo en el cual el promotor tardío está activo (Longworth y col., 2004) (Abdul y col., 2009) (Mc. Bride., 2008).

Por si misma la proteína E1 se une débilmente a las secuencias de origen a través un dominio de unión al ADN (DBD), pero esta unión es estabilizada por la formación del complejo con E2; una vez unida, las proteínas E1 forman hexámeros que tienen alta afinidad por el ADN y se induce la distorsión localizada del mismo, lo cual facilita el reclutamiento de moléculas adicionales de E1 y el desplazamiento eventual de E2; como otras helicasas, el ADN viral pasa a través del centro del anillo hexamérico. Estos complejos de E1 desenrollan de manera eficiente el ADN superenrollado con la ayuda de proteínas chaperonas. E1 también se une a la polimerasa alfa y ayuda a reclutar complejos de replicación celular en el origen así como complejos de remodelación de cromatina para modular el posicionamiento del nucleosoma y permitir el avance adecuado de la hebra de replicación (Longworth y col., 2004) (Kadaja y col. 2009). De igual manera E1 puede asociarse con las proteínas celulares del shock térmico (Hsps) en particular con Hsp40 y Hsp70 y esto contribuye a la formación de dihexámeros de E1 (Doorbar, 2006).

- **Proteína E2**

La proteína E2 tiene un peso aproximado de 50 kDa y actúa en forma dimérica, además contiene tres dominios funcionales: un dominio C-terminal de unión al ADN (DBD) que reconoce un motivo palindrómico [AACCg(N4)cGGTT] en el LCR, un dominio N-terminal de activación de la transcripción y replicación del ADN (TAD) y una región central o región de bisagra que une a estos dos dominios y le confiere estabilidad a la proteína; E2 también juega papeles importantes en la regulación de la transcripción de VPH y en la segregación de los genomas de VPH entre las células hijas después de la división celular (Abdul y col., 2009) (Longworth y col., 2004) (Doorbar, 2006).

E2 se une al ADN como un dímero a través de su extremo C-terminal y con E1 a través de su extremo N-terminal, asimismo el extremo N-terminal es responsable de la interacción con los factores de transcripción como Brd4, Sp1, TFIIB y AMF-1 y es importante para el control transcripcional de E6 y E7. E2 también puede formar un complejo con los factores de transcripción C/EBP, los cuales regulan muchos promotores de genes implicados en la diferenciación (Abdul y col., 2009) (Doorbar, 2006).

Además de su papel en la regulación de transcripción, la sobreexpresión de la proteína E2 puede inducir apoptosis mediante un mecanismo independiente de p53. E2 también juega un papel importante en la segregación del genoma viral entre las células hijas después de la división celular. Asimismo, E2 puede inducir el arresto del crecimiento, senescencia y muerte celular por apoptosis de manera directa por interacción con proteínas celulares o de manera indirecta debido a sus efectos en la expresión de las proteínas E6 y E7. De igual manera E2 interactúa con la proteína 1 de unión a topoisomerasa II (TopBP1), lo cual trae consecuencias en la replicación y regulación transcripcional durante la infección viral (Abdul y col., 2009) (Boner y col. 2002.).

Aunque E1 y E2 son claves en la amplificación del genoma viral, las proteínas E4 y E5 también contribuyen. E4 se acumula en las células en el momento de la amplificación del genoma viral (Doorbar, 2006).

- **Proteína E4**

El marco de lectura de *E4* es traducido a partir de transcritos empalmados como fusión con los primeros cinco aminoácidos de *E1* para generar la proteína de fusión $E1^E4$. El marco de lectura de *E4* carece del codón iniciador AUG y usa la secuencia de *E1* para el inicio de la traducción. Todos los papilomavirus expresan $E1^E4$ en la fase tardía del ciclo viral, pero con poca homología en la secuencia. Las proteínas *E4* de los VPHs de alto riesgo también juegan un papel en la regulación de la expresión genética debido a que interactúan con una ARN helicasa, *E4-DBD*, la cual es un miembro de la familia de helicasas implicadas en el empalme del ARNm, transporte e inicio de la traducción. Además, se ha demostrado que la sobreexpresión de $E1^E4$ de los VPH de alto riesgo induce un arresto en la fase G2 del ciclo celular en una variedad de tipos celulares. El rol de la proteína *E4* no está claro, sin embargo, dicha proteína se asocia al colapso de la malla de citoqueratina celular, lo cual podría facilitar la liberación viral. Debido a que *E4* se acumula en los estadios tardíos de la infección, se considera como una proteína tardía (Abdul y col., 2009) (Longworth y col., 2004).

- **Proteína E5**

La proteína *E5* es una pequeña proteína hidrofóbica; la misma se localiza en la membrana endosomal y en el aparato de Golgi, pero en ciertas ocasiones se encuentra en las membranas celulares; la proteína *E5* puede asociarse con la ATPasa vacuolar de protones y retardar el proceso de acidificación vacuolar. Se cree que esto afecta el reciclaje de los receptores de factores de crecimiento en la superficie celular y conlleva a un incremento de receptores de señalización mediado por el factor de crecimiento epidermal y el mantenimiento de una replicación adecuada en las capas epiteliales superiores. La proteína *E5* se une al receptor de factor de crecimiento epidermal y cumple una función transformadora al asociarse con el receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas (Longworthy col., 2004) (Doorbar, 2006).

La proteína *E5* es expresada principalmente durante la fase tardía del ciclo celular en las células epiteliales diferenciadas; la pérdida de *E5* resulta en la alteración de la activación de

las funciones virales tardías en células diferenciadas, lo que sugiere que actúa principalmente en este tipo de célula. La proteína E5 además tiene un efecto aditivo en las propiedades transformantes de E6 y E7 y puede ser considerada como un oncogén debido a que posee la habilidad de transformar fibroblastos y queratinocitos en cooperación con E7. Esta propiedad de E5 probablemente está relacionada a la capacidad de modular la señalización celular a través de la asociación con la ATPasa vacuolar de protones y la consecuente disminución en la acidificación endosomal. Asimismo, la proteína E5 contribuye a incrementar la proliferación de células infectadas por VPH probablemente porque inhibe la apoptosis (Abdul y col., 2009) (Longworth y col., 2004) (Doorbar, 2006.). E5 también disminuye la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, ayudando al virus a evadir la respuesta del sistema inmune del hospedero (Mc. Bride, 2008).

- **Proteína E6**

La proteína E6 tiene una longitud aproximada de 160 aminoácidos y contiene 2 motivos de unión al zinc atípicos, los cuales contienen dos cisteínas (Cys-X-X-Cys) que son conservadas en todos los tipos de VPH. Esta proteína es un factor de transcripción que puede desencadenar el arresto del ciclo celular o la apoptosis en respuesta a variados estreses celulares como la hipoxia o los daños al ADN (Ghittoni y col., 2010). Las proteínas E6 de los VPH de alto riesgo se localizan en el núcleo y citoplasma celular, mientras que las E6 de los tipos de bajo riesgo se encuentran predominantemente en el citoplasma debido a la ausencia de dos señales de localización nuclear que se encuentra en los tipos de alto riesgo (Abdul y col., 2009).

La función mejor entendida de la proteína E6 de los tipos de alto riesgo es su habilidad para inducir la degradación de p53 y facilitar su degradación debido a la formación de un complejo con la ubiquitin ligasa celular E6AP; aunque E6 de los tipos de bajo y de alto riesgo se unen a p53, sin embargo, los de bajo riesgo no la marcan para degradación debido a que se une a la región C-terminal de p53, mientras que la E6 de los tipos de alto riesgo se unen a la región C-terminal y al dominio central y solo la interacción con este dominio conllevará a su degradación posterior también puede bloquear la actividad transcripcional

de p53 por inhibición de la transcripción del coactivador de p300. Sin embargo, esta no es la única función de E6, ya que la proteína E6 unida a otras proteínas de VPH se asocia al cáncer de piel pero no en interacción con p53 sino por su habilidad para transformar células (Abdul y col. 2009) (Scheffner y col., 1990).

Asimismo, la proteína E6 de los tipos de alto riesgo marcan muchas otras proteínas para degradación mediante proteasoma incluyendo al efector apoptótico Bak, aunque los tipos de bajo riesgo también marcan a Bak para su degradación, estos son menos efectivos que las proteínas de los tipos alto riesgo. Las proteínas E6 de los tipos de alto riesgo también interactúan con miembros de la familia de proteínas PDZ, ya que se unen a los dominios PDZ y promueven la degradación mediante proteasoma. Una función de las proteínas E6 de los tipos de alto riesgo que es sumamente importante para la inmortalización celular es su habilidad para activar la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa hTERT; la actividad telomerasa es usualmente encontrada en células embrionarias y está ausente en células somáticas normales, así, cuando una célula normal se divide, las regiones del telómero se acortan con cada ronda de división y eventualmente se produce inestabilidad y senescencia, sin embargo, las proteínas E6 de los tipos de alto riesgo mantienen la longitud telómero a través de la acción de telomerasa (Abdul y col.,2006) (Klingelutz y col., 1996).

- **Proteína E7**

La proteína E7 está compuesta por aproximadamente 100 aminoácidos y contiene tres regiones conservadas: CR1, CR2 y CR3. La proteína E7 en los tipos de alto riesgo pueden inmortalizar las células humanas ya que se expresa como oncogén. CR2 contiene un motivo LXCXE que media la unión de E7 a la familia de proteínas de bolsillo pRb, p107 y p130. pRb juega un papel importante en la replicación del ADN, reparación del ADN, prevención de la apoptosis, diferenciación y senescencia celular. Las proteínas E7 de los tipos de bajo riesgo y alto riesgo se unen a pRb pero con diferente afinidad; las de alto riesgo se unen con 10 veces más que los de bajo riesgo (Abdul y col., 2009).

La asociación de E7 con los miembros de la familia de proteínas reguladoras del ciclo celular también ha sido bien caracterizada. pRb es un regulador negativo del ciclo celular

que controla la entrada a la fase S debido a que se asocia con miembros de la familia de los factores de transcripción de unión al ADN E2F; E7 altera esta función porque se une a pRb y desplaza las proteínas E2F; las células entonces entran a la fase S y se activan los factores de replicación celular que son requeridos para la replicación viral. E7 también marca a pRb para degradación proteolítica mediante ubiquitinación a través del proteasoma 26S. E7 también induce un número anormal de centrosomas y la inestabilidad genómica puede inducir la malignización y el acortamiento de los cromosomas de la célula hospedera durante la mitosis (Abdul y col., 2009).

Es importante acotar que E7 puede alterar los controles del ciclo celular independientemente de los efectos en las proteínas de bolsillo; tanto las E7 de los tipos de bajo como de alto riesgo puede inhibir la senescencia celular inducida por la proteína de leucemia promielocítica (PML). Las proteínas E7 de los tipos de alto y de bajo riesgo se asocian con la remodelación de la cromatina; debido a que E7 se une a la histona deacetilasa de manera indirecta a través de Mi β 2, el cual es un componente del complejo de deacetilación de remodelación del nucleosoma, lo cual altera el arresto exitoso del ciclo celular (Abdul y col., 2009).

- **Proteína L2**

La proteína L2 es codificada por un marco abierto de lectura aproximado de 1400 pb, el mismo codifica una proteína de 473 aa con un peso de 78 kDa. (Doorbar y col., 1987) (Forslund y col. 1996). La proteína L2 contiene una serie de residuos hidrofóbicos de carga positiva en su extremo C-terminal, los cuales tienen capacidad destructora de la membrana y median la estrecha asociación del ADN con las membranas en ausencia de chaperonas celulares (Sapp y col., 2009).

Un grupo de 44 aminoácidos ubicados en la región C-terminal de L2 facilitan la interacción de L2 con L1, en su mayoría son residuos conservados de prolina, mientras que en el extremo C-terminal se encuentra el dominio de unión al ADN; asimismo existe un dominio de 88 residuos responsable de neutralizar la respuesta de los anticuerpos y se ubica en el extremo N-terminal; por otra parte, estudios realizados con partículas tipo virus han

demostrado que los residuos ubicados entre 108-120 y 69-81 son epítopes y se muestran en la superficie de los viriones (Lowe y col., 2008).

La implicación de L2 en la encapsidación del genoma acoplado con las propiedades unión al genoma sugiere que L2 forma múltiples contactos con el genoma viral dentro del virión además de los contactos que forma con los pentámeros de L1 y se ha demostrado que tanto los dominios de unión al ADN como los de unión a los pentámeros son conservados en L2 en todos los alfa papilomavirus (Lowe y col., 2008).

Los roles propuestos para L2 incluyen la inducción de cambios conformacionales en la unión del virión a la célula, alteración de las membranas endosomales y tráfico subcelular durante la entrada del genoma viral. (Buck y col., 2008). Además, la proteína L2 se ha propuesto como candidato para vacuna profiláctica debido a que induce la neutralización cruzada contra L1 en modelos animales experimentales (Combelas y col. 2010).

- **Proteína L1**

La proteína L1 pesa entre 52 y 57 kDa y una longitud aproximada de 500 residuos de aminoácidos (Tomita y col. 1987) (Doorbar y col. 1987). Esta proteína es codificada por una región de aproximadamente 1600 pb (PubMed NC_001526.2), la cual se ubica entre las posiciones 5430 y 7175 pb del genoma viral (Zheng y col. 2006) (Wang y col. 2011). La proteína L1 está formada por diez láminas β , cinco α -hélices y cinco regiones que forman bucles externos denominados DC, DE, EF, FG y HI los cuales están formados por los residuos aminoacídicos ubicados entre las posiciones 50-69, 110-153, 160-189, 262-291 y 348-360 respectivamente, todas ellas son altamente antigénicas (Lowe y col. 2008) (Bishop y col. 2007).

La proteína L1 se agrupa en trímeros y posteriormente en pentámeros y estos últimos tienen la propiedad de autoensamblarse en cápsidas vacías; la interacción de los monómeros es mediada por dos cisteínas ubicadas alrededor de las posiciones 201 y 454 (Lowe y col., 2008) (Bishop y col. 2007). Cada pentámero de L1 tiene cinco proyecciones laterales semejantes a codos o de "V" invertida que están compuestos aproximadamente de 100 residuos en el extremo C-terminal. Cada codo proyectado consiste de una α -hélice (hélice 4

o h4) anclada a la estructura central a través de otras dos hélices: h2 y h3. Los pentámeros están unidos a través de fuertes interacciones hidrofóbicas entre h4 en un pentámero con h2 y h3 de un pentámero vecino. El resto de residuos C-terminales retornan al centro de L1 para formar la quinta hélice h5. Se ha demostrado que h2 y h3 son esenciales para el plegamiento de L1 y la producción de los pentámeros mientras que h4 es indispensable para el ensamblaje de partículas con topología T=7. De igual manera, h5 tiene un rol importante en el plegamiento de L1 (Bishop y col. 2007) Ver figura 3.

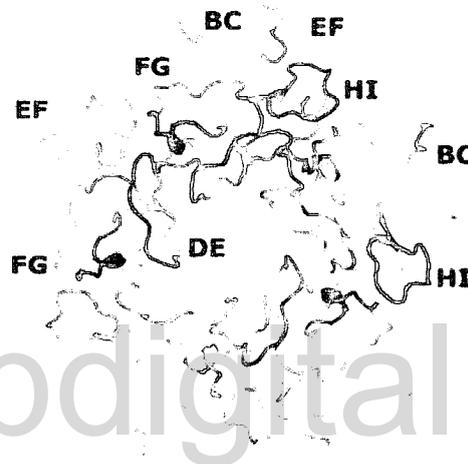


Figura 3. Estructura de cristal de un pentámero de L1 VPH 16 en el cual se muestra cada monómero de un color diferente y se muestra el entrelazamiento de los bucles (Bishop y col. 2007)

Por su parte, pruebas experimentales han concluido que cercano al extremo C-terminal de la proteína L1 existe un dominio de unión al ADN e implicado en su empaquetamiento dentro del virión; esta región es rica en lisina y es altamente conservada entre la familia de alfa papilomavirus así como todo el extremo C-terminal; además existen tres residuos de lisina (278, 356 y 361) los cuales interactúan con las cadenas de heparan sulfato en la superficie celular del hospedador; en esta región también se ubica un dominio de unión a L2 (Lowe y col. 2008).

- **Estructura del Virus de Papiloma Humano**

Los papilomavirus son virus no envueltos de ADN doble banda de aproximadamente 55 nm de diámetro y con un genoma circular de 8 kb de longitud dentro de una cápside icosaédrica externa (Herrington, 1994) (Sapp y col., 2009) (Ghittoni y col., 2010), la cual está compuesta por 360 moléculas de proteína mayor de la cápside (L1), las cuales están organizadas en 72 capsómeros, cada una compuesta por un ensamblado pentamérico de L1. De los 72 capsómeros, doce son pentavalentes y sesenta son hexavalentes; los capsómeros tienen un tamaño aproximado de 10 nm o 600 Å y poseen un coeficiente de sedimentación entre 10,2S y 10,4S (Sapp y col., 2009) (Schädlich y col., 2009).

Los capsómeros forman un enrejado de simetría icosaédrica $T=7$ y la interacción entre los mismos es estabilizada por la proteína L2, de las cuales pueden haber doce o más por virión; estudios sugieren que una molécula de L2 ocluye el centro de cada capsómero pentavalente. (Conway y col. 2009) (Lowe y col., 2008) (Sapp y col., 2009). Sistemas experimentales solo con la proteína L1 han demostrado la formación de partículas tipo virus (VLP) de topología $T=1$, lo que sugiere que L2 es indispensable para la adquisición de topología $T=7$. (Modis y col., 2002) (Bishop y col., 2007) además, L2 mejora la capacidad infecciosa y la encapsidación del ADN dentro de la partícula aunque también podrían existir proteínas celulares y factores como las chaperonas y las carioferinas que alteren la estructura final de virión (Conway y col., 2009). La proteína L2 se asocia con la proteína L1 a través de una región hidrofóbica ubicada cerca de la región C-terminal de la proteína L2. (Doorbar, 2006). En el modelo propuesto por Lowe y col. (2008), los bucles DE y FG de L1 están implicados en la interacción con L2, específicamente con una región rica en prolina y estos se ubican en la cara externa de la estructura. Los aminoácidos 105-120 del bucle DE interactúa con dos prolinas altamente conservadas ubicadas entre las posiciones 53 y 59 de L2. El bucle FG de L1 interactúa con prolinas altamente conservadas de L2 que se ubican en las posiciones 24-20 y 260-264 y son quienes forman el centro del pentámero de L1.

Se ha propuesto que los pentámeros se unen mediante el modelo del brazo invasor, en el cual los extremos C-terminal de las proteínas L1 forman el principal contacto interpentamérico por extensión de la subunidad de origen e invasión de una subunidad en el pentámero adyacente. Cada pentámero recibe cinco brazos invasores y dona cinco brazos invasores a los pentámeros adyacentes, además, la interacción entre los pentámeros es estabilizada por interacciones de cisteína ubicadas en las posiciones C22 y C28 de la proteína L2 (Conway y col. 2009) (Lowe y col. 2008) (Modis y col., 2002) (Bishop y col., 2007).

La cápside se ensambla de manera óptima a pH 5,4 y en elevada fuerza iónica, mientras que a pH elevado (aprox 8,2) y en presencia de agentes reductores se favorece el desensamblaje de la cápside en capsómeros debido a la ruptura de los puentes disulfuro que mantienen unidos a los capsómeros (Schädlich y col., 2009).

www.bdigital.ula.ve

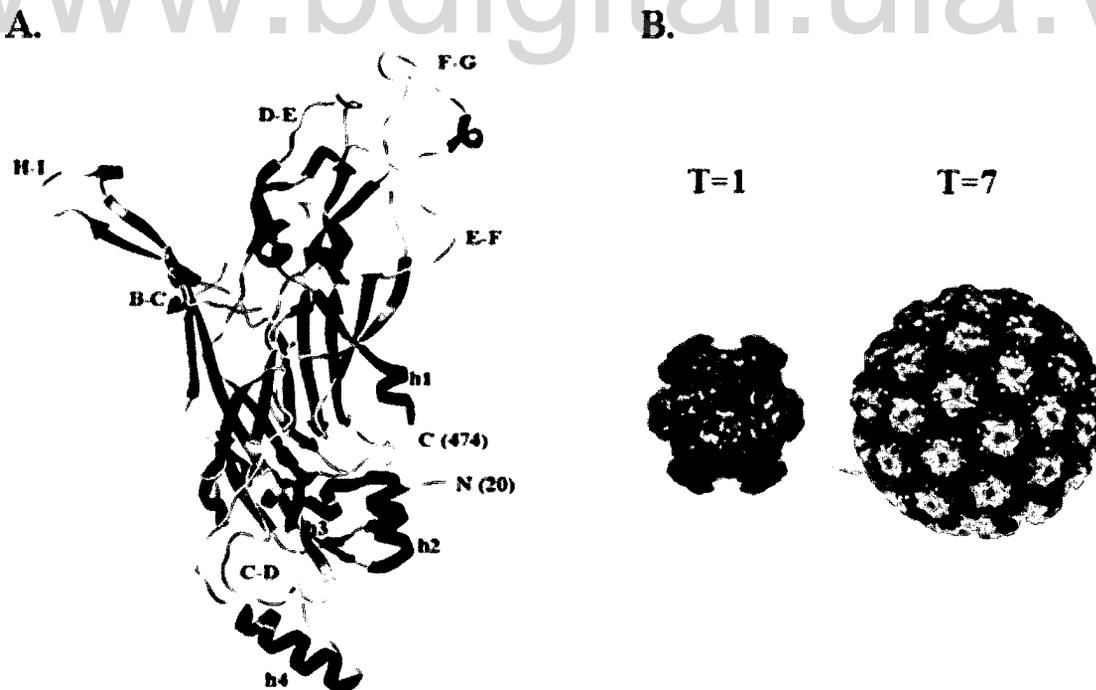


Figura 4. Estructura atómica de proteína de la cápside mayor L1 de VPH16. (A) Resolución atómica del monómero (B) Comparación de una partícula pentamérica de HPV16 de topología T1 formada por 12 pentámeros debido al N-terminal truncado y pentámero nativo de topología T7 (Conway y col. 2009).

- **Clasificación taxonómica de VPH**

En los últimos 30 años se ha visto un desarrollo de la taxonomía de papilomavirus, que evolucionó desde la hibridación cruzada y patrones de restricción hasta algoritmos filogenéticos comparando genomas completos o segmentos subgenómicos (de Villiers y col., 2004).

Los papilomavirus originalmente fueron agrupados juntos con los Polyomavirus en la familia *Papovaviridae* en base a su similitud en las cápsides no envueltas y el ADN doble banda circular, sin embargo, posteriormente, el Comité de Taxonomía de Virus (ICTV) lo reconoció como dos grupos virales *Papillomaviridae* y *Polyomviridae*, con diferentes tamaños y organización genómica diferente y pocas similitudes en la secuencia de aminoácidos y nucleótidos (de Villiers y col. 2004).

En la fase temprana del desarrollo de la taxonomía de papilomavirus se utilizaron lesiones y verrugas de pacientes con *Epidermiodysplasia verruciformis* a los cuales se le aislaron grandes cantidades de partículas virales de las cuales se extrajo el ADN. Estas preparaciones de ADN fueron clasificadas comparando los patrones de restricción e hibridación cruzada; posteriormente en 1970 se le agregó un número para identificar el tipo, por ejemplo: VPH 1. Tiempo después se secuenciaron los genomas completos de VPH 1, 6 y 16 (de Villiers y col., 2004).

Cientos de nuevos tipos de papilomavirus han sido identificados mediante el uso de PCR con oligonucleótidos degenerados o de consenso. El marco de lectura más utilizado es el de L1 por ser el más conservado dentro del genoma, sin embargo para clasificarlo como un miembro dentro del género de papilomavirus se requiere el aislamiento y caracterización del genoma completo; posteriormente este genoma se deposita en el Centro de Referencia de Papilomavirus ubicado en Heidelberg-Alemania donde se verifica la organización del genoma y su secuencia es identificada como un nuevo tipo, subtipo o variante de papilomavirus (de Villiers y col., 2004). Se ha diseñado un árbol filogenético basado en la homología de la secuencia nucleotídica de la proteína mayor de la cápside L1, originando diferentes géneros (Ghittoni y col., 2010) Ver Figura 5.

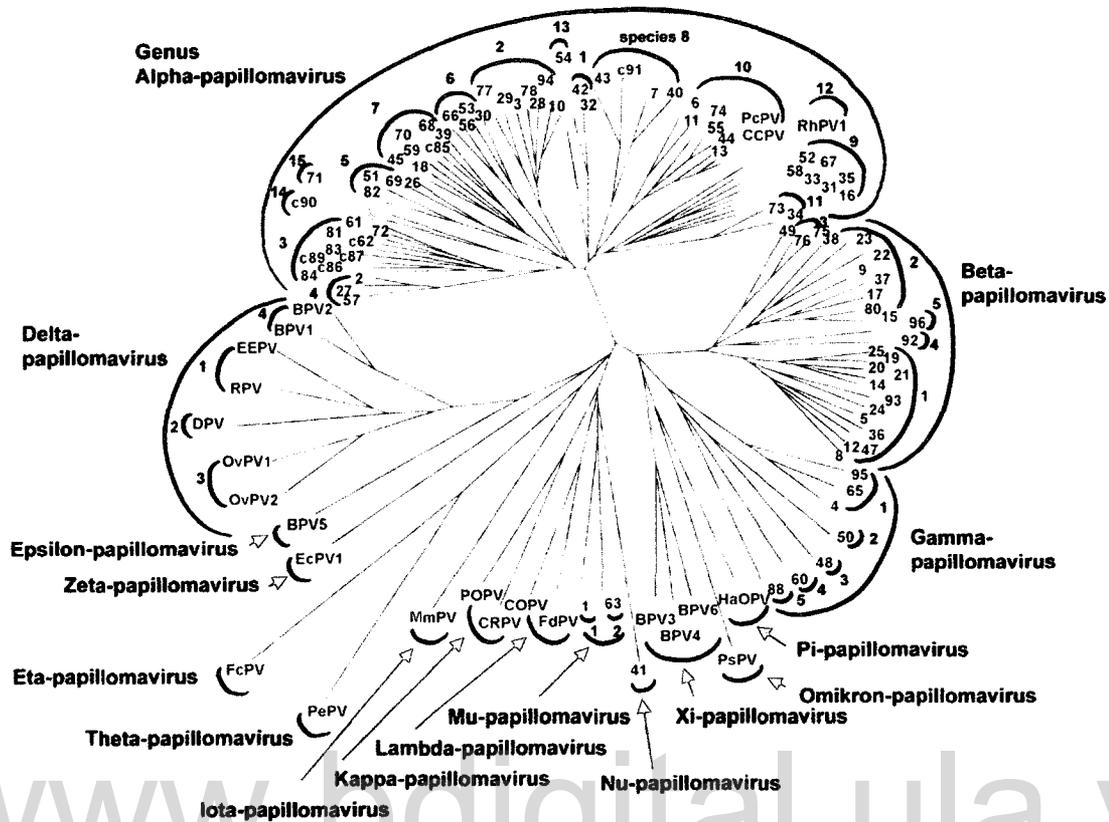


Figura 5: Árbol filogenético contenitivo de las secuencias de 118 tipos de papilomavirus. Los números en los extremos de cada una de las ramas identifican un tipo de VPH. Los símbolos semicirculares ultraperiféricos identifican géneros de virus del papiloma humano. El número en el símbolo semicircular interior se refiere a especies de virus del papiloma humano. (de Villiers y col., 2004).

Comparaciones extensivas de las secuencias de los marcos de lectura de L1 de 96 tipos de papilomavirus humanos y 22 papilomavirus animales permitieron establecer las siguientes clasificaciones (de Villiers y col., 2004):

- 1.) Los grupos de orden mayor que habían sido previamente denominados supergrupos o ramas mayores, se denominan ahora género y para que se consideren géneros diferentes deben tener por lo menos 60% de diferencia en la secuencia nucleotídica del marco de lectura de L1. Las secuencias completas que tienen más de 23% de diferencia, pero menos de 43% pertenecen al género *Papillomaviridae*.

- 2.) Los grupos de orden menor de papilomavirus que habían sido denominados grupos, subgrupos o ramas menores ahora se denominan especies. Tales especies dentro de un género deben tener una identidad nucleotídica de L1 entre 60 y 70%.
- 3.) Los tipos dentro de las especies deben tener una identidad nucleotídica entre 71 y 89% dentro del marco de lectura de L1.
- 4.) Los subtipos deben tener una diferencia genética en el marco de lectura de L1 entre 2 y 10% dentro de los tipos; mientras que las variantes deben tener entre 1 y 2% de diversidad en la secuencia genómica, sin embargo, esta pequeña diversidad filogenética está ligada a la evolución del virus y del hospedero y está siendo ampliamente discutida.

Los dos principales géneros de VPH son el alfa y el beta, en los cuales se incluyen aproximadamente el 90% de los virus caracterizados. En el género de los alfa papilomavirus se encuentran los tipos con tropismo mucosa/genital, también incluyen los virus cutáneos tales como el VPH 2 que causa verrugas comunes y rara vez se asocian con cáncer mientras que los beta-papillomavirus están asociados con infecciones no manifiestas, sin embargo, en individuos inmunocomprometidos y en pacientes que padecen epidemodisplasia verruciforme estos virus pueden expandirse y asociarse al desarrollo de cáncer de piel de tipo no melanoma (Doorbar, 2006).

Los tipos de VPH de mucosa se dividen en 2 grupos: VPH de bajo riesgo oncogénico, los cuales se asocian comúnmente con lesiones benignas genitales y los virus de alto riesgo oncogénico que son los agentes etiológicos del cáncer cervical y otros cánceres humanos. Las especies vinculadas con el cáncer invasivo son las alfa-7 y alfa-9, especialmente los tipos 16 y 18 respectivamente, los cuales están asociados a cáncer cervical y otros tumores invasivos, de hecho, VPH 16 es el tipo de alto riesgo prevalente en la población mundial y es responsable de aproximadamente del 75% de todos los cánceres cervicales mientras que el tipo 18 es el agente causal de otro 15%; por su parte, los tipos de bajo riesgo como VPH 6 y 11 sólo en raras ocasiones se asocian con cáncer cervical pero es tienen elevada importancia clínica debido a que causa verrugas genitales (Chen y col., 2011) (Ghittoni y col., 2010) (Abdul y col., 2009) (Doorbar, 2006).

Sin embargo, Chen y col. (2011) reportaron que el ICTV no ha reconocido la terminología “Tipo” ni la denominación de grupo de especies por número así como los serotipos, cepas, ni variantes. La lista principal “Master Species List 2011” de ICTV clasifica a los papilomavirus de la siguiente manera (Ver tabla 3):

Tabla 3: Clasificación de géneros y especies de VPH (ICTV 2011).

Familia	Género	Especie
<i>Papillomaviridae</i>	Alphapapillomavirus	Alphapapillomavirus 1
		Alphapapillomavirus 10
		Alphapapillomavirus 11
		Alphapapillomavirus 12
		Alphapapillomavirus 13
		Alphapapillomavirus 14
		Alphapapillomavirus 2
		Alphapapillomavirus 3
		Alphapapillomavirus 4
	Betapapillomavirus	Alphapapillomavirus 5
		Alphapapillomavirus 6
		Alphapapillomavirus 7
		Alphapapillomavirus 8
		Alphapapillomavirus 9
		Betapapillomavirus 1
	Betapapillomavirus	Betapapillomavirus 2
		Betapapillomavirus 3
		Betapapillomavirus 4
		Betapapillomavirus 5
Betapapillomavirus 6		
Chipapillomavirus		Chipapillomavirus 1
	Chipapillomavirus 2	
Deltapapillomavirus	Deltapapillomavirus 1	
	Deltapapillomavirus 2	
	Deltapapillomavirus 3	
	Deltapapillomavirus 4	
	Deltapapillomavirus 5	
<i>Papillomaviridae</i>	Dyodeltapapillomavirus	Dyodeltapapillomavirus 1
	Dyoepsilonpapillomavirus	Dyoepsilonpapillomavirus 1
	Dyoetapapillomavirus	Dyoetapapillomavirus 1
	Dyoiotapapillomavirus	Dyoiotapapillomavirus 1
	Dyothetapapillomavirus	Dyothetapapillomavirus 1
	Dyozetapapillomavirus	Dyozetapapillomavirus 1
	Epsilonpapillomavirus	Epsilonpapillomavirus 1
	Etapapillomavirus	Etapapillomavirus 1

Gammapapillomavirus	Gammapapillomavirus 1
	Gammapapillomavirus 10
	Gammapapillomavirus 2
	Gammapapillomavirus 3
	Gammapapillomavirus 4
	Gammapapillomavirus 5
	Gammapapillomavirus 6
	Gammapapillomavirus 7
	Gammapapillomavirus 8
Gammapapillomavirus 9	

Por su parte, Burk y col. en 2011 realizaron el alineamiento del genoma de todos los tipos descritos en la base de datos de GENE BANK a partir del codón de inicio del marco de lectura de E1 y agruparon cada tipo dentro de las diferentes especies de la siguiente manera (Ver tabla 4):

Tabla 4: Agrupamiento de especies y tipos de VPH según Burk y col. 2011.

Especie	Tipos
Alfa-1	32,42
Alfa-2	3,10,28,29,77,94,117,125
Alfa-3	61,62,72,81,83,84,86,87,89,102, 114
Alfa-4	2,27,57
Alfa-5	26,51,69,82
Alfa-6	30,53,56,66
Alfa-7	18,39,45,59,68,70,85,97
Alfa-8	7,40,43,41
Alfa-9	16,31,33,35,52,58,67
Alfa-10	6,11,13,44,74
Alfa-11	34,73
Alfa-13	54
Alfa-14	71,90,106

Chen y col. (2011) reportaron que excepto para VPH 16, 18, 45 y 97 no se ha hecho un estudio sistemático de la variación del genoma de los otros tipos de VPH ni un sistema de clasificación lógica y estándar del linaje de variantes; asimismo, el grupo alfa-9 juega un papel importante en el cáncer humano y las variantes tienen diferentes potenciales patológicos, por tanto, se necesita un estudio evolutivo así como un sistema de clasificación

adecuado que de acuerdo al riesgo oncogénico de las variantes así como la persistencia viral.

- **Ciclo de Vida**

La infección inicial por VPH ocurre a través de microabrasiones del tejido epitelial, lo que permite la entrada de la partícula viral en las células (Conway y col., 2009), específicamente en los queratinocitos basales de la mucosa epitelial (Horvath y col., 2010), la cual consiste principalmente de células pluripotenciales y de tránsito que están continuamente dividiéndose y proveen un reservorio de células para las capas suprabasales (Longworth y col., 2004). El ciclo de vida de VPH está estrictamente ligado al programa de diferenciación de los queratinocitos del hospedador, a través del cual ocurre el ensamblaje de los viriones maduros y está restringido a la diferenciación terminal de las células suprabasales, limitado en parte por el promotor tardío dependiente de diferenciación (Conway y col., 2009).

Uno de los receptores celulares para el virus de papiloma humano es la α -integrina, la cual fue la primera proteína descrita como receptor para el VPH, específicamente para el VPH tipo 6B (Letian y col., 2010) (Drobni., 2005); las integrinas por su parte son glicoproteínas compuestas por subunidades α y β y son expresadas en varios tipos celulares principalmente en la matriz celular y en las interacciones célula-célula. Hasta el presente se conocen 17 subunidades α y 8 subunidades β , de las cuales $\alpha 6$, $\beta 4$ y $\beta 1$ se han implicado en la unión de VPH específicamente el heterodímero $\alpha 6\beta 4$, el cual presenta una alta expresión en la superficie de las células epiteliales que migran al sitio de la abrasión una vez que ocurre la lesión del tejido. (Letian y col., 2010). Sin embargo, evidencia experimental ha demostrado que las integrinas cumplen su función como receptor o correceptor secundario para la entrada del virus (Horvath y col., 2010), de igual manera, la laminina 5 también está asociada a $\alpha 6\beta 4$ en la matriz extracelular y algunos investigadores los han reportado como un receptor para la entrada de VPH (Pyeon y col., 2009).

Existe otro receptor para la entrada del virus a la célula: el glicosaminoglicán específicamente el heparan sulfato; los glicosaminoglicanos se encuentran en la matriz

extracelular y en la superficie de muchas células y están implicados en una variedad de fenómenos biológicos como organogénesis, angiogénesis, inflamación y adhesión celular (Horvath y col., 2010) (Letian y col., 2010). El heparan sulfato es frecuentemente encontrado en dos proteoglicanos unidos a la membrana a saber: sindecanos y glipicanos. Los glipicanos se expresan predominantemente en el sistema nervioso central, mientras que los sindecanos en las células epiteliales, las cuales son las células diana para el VPH, especialmente sindecano 1. El heparan sulfato es fundamental en la unión del VPH a la célula ya que se ha demostrado de manera experimental que la presencia de heparinasa o heparatinasa resulta en una disminución de la unión del virus a los queratinocitos (Horvath y col., 2010) (Letian y col., 2010) (Drobni P. 2005).

La conformación de las partículas de VPH es considerada crítica para la unión celular, inicialmente, Joyce y col (1999). identificaron una región conservada de unión al heparan en la región carboxiterminal de la proteína L1 en nueve tipos de VPH; esta región está conformada por quince residuos de aminoácidos de tipo general XBBBBXB donde B puede ser lisina, arginina o histidina. Por su parte, la estructura del heparan sulfato es igual de esencial para la unión del virus, debido a que el heparan sulfato contiene oligosacáridos no ramificados compuestos por unidades de disacáridos alternantes de ácido urónico y glucosamina, las cuales son sulfatadas y acetiladas en varios grados, de hecho, se ha demostrado que la O-sulfatación es necesaria para la unión del virus a la membrana (Letian y col., 2010) (Sapp y col., 2009).

Además, la interacción de la cápside con el heparan sulfato, permite la exposición de la región amino terminal de la proteína L2, y como consecuencia hay acceso a una región consenso altamente conservada, el cual es sitio de reconocimiento para la furina y su posterior corte en la superficie celular, lo que conlleva a la neutralización cruzada de epítopes accesibles para la unión de anticuerpos. Además de la neutralización dependiente de L2 debe ocurrir subsecuentes cortes proteolíticos necesarios para la infección exitosa; por su parte, se ha demostrado que mutaciones en residuos de cisteína de la proteína L2 impide la formación de viriones infecciosos (Sapp y col., 2009).

Aunque las interacciones del virus en la superficie celular, muchos estudios sugieren que un papel de L2 es facilitar la infección mediante la interacción con uno o varios receptores secundarios, también se ha demostrado que la isomerasa celular ciclofilina B peptidil-prolil cis/trans (CyPB) interactúa con el heparan sulfato y además facilita la exposición del extremo N terminal de L2. Estas observaciones indican que el virus se une a la superficie celular mediante más de un receptor, la cual necesita una unión de baja especificidad mediada por L1 seguida de una interacción más específica de L2 (Horvath y col., 2010) (Sapp y col., 2009)

La unión inicial de los motivos de heparan funciona como un paso crítico para el corte proteolítico de L2, lo cual es esencial para la infección exitosa. La proteína menor de la cápside L2 es cortada por furina en la superficie de la célula en un sitio de consenso común para todos los tipos de papilomavirus. Estas secuencias son inaccesibles en la superficie de los viriones maduros y por tanto previene el ataque de la respuesta inmune del hospedador a dichos epítopes. Posterior al corte de L2 por furina ocurre un cambio conformacional que expone el sitio de unión para el receptor celular secundario (Horvarth y col., 2010).

Una vez que ha ocurrido la adsorción a los receptores de la superficie celular, se produce la internalización de los viriones para establecer una infección y dependiendo del tipo de VPH puede entrar mediante clatrina, caveolas o ambas inclusive (Horvarth y col., 2010) (Conway y col., 2009). La endocitosis mediada por clatrina, se ha considerado como la principal vía de entrada de muchos virus, el cual es iniciado por la unión del ligando a un receptor, lo que resulta en la formación de un complejo ligando-receptor en la superficie celular, la cual luego se invagina para finalmente formar una vesícula recubierta por clatrina (Letian y col, 2010), la cual interactúa con otras moléculas esenciales incluyendo Eps15, ampifisina y las proteínas adaptadoras AP-2, así como la dinamina GTPasa, la cual es responsable de la liberación de la vesícula de la membrana plasmática (Sieczkarski y col., 2002), posteriormente, la vesícula progresa a endosoma temprano en una vía dependiente de Rab5 antes de fusionarse con otras para formar el endosoma tardío o lisosoma, controlado por Rab7. Y las moléculas internalizadas mediante endocitosis mediada por clatrina experimentan un rápido declive del pH (Letian y col., 2010).

Datos experimentales han demostrado que los virus de ADN no envueltos son internalizados principalmente por esta vía (Bousarghin y col., 2003), sin embargo, datos experimentales han demostrado que el virus de papiloma una vez que ingresa a la célula mediante endocitosis por la vía dependiente de clatrina cambia su conformación una vez que el pH del endosoma disminuye y resulta en el escape del genoma viral o del complejo genoma-L2, VPH 16 ingresa mediante esta vía (Letian y col., 2010).

Otra vía de ingreso del virus a la célula es mediante la endocitosis caveolar, la cual es muy utilizada por los virus o envueltos y de tamaño menor a 55nm, como es el caso de VPH, y se ha descrito específicamente en los tipos 31 y 58 (Letian y col., 2010) (Bousarghin y col., 2003); la endocitosis caveolar es más lenta que la vía mediada por clatrina, lo que resulta en una dificultad en la acidificación de la vesícula, además, la internalización vía caveola no es un proceso constitutivo. Otros estudios han demostrado que la endocitosis caveolar ocurre a través de los caveosomas sin pasar por endosomas y se mueven hacia el aparato de Golgi y/o retículo endoplásmico, se ha demostrado que VPH 31 sigue esta vía. (Letian y col., 2007); así como es el caso de VPH 33 cuya internalización depende de la actina del citoesqueleto sin que se haya demostrado alteración de la caveola (Sapp y col., 2009).

Durante muchos años se pensó que las dos vías previamente mencionadas ocurrían de manera paralela pero independiente una de la otra, sin embargo, se ha demostrado que la carga podría moverse a través de ellas con la ayuda de algunas otras moléculas como Rab5 y GTPasa (Letian y col., 2007).

Por otra parte, algunos tipos de VPH como el tipo 16 ha demostrado la capacidad de ingresar a la célula mediante una vía de clatrina y caveola independiente y existe suficiente evidencia de que en el proceso de endocitosis se encuentran implicados microdominios enriquecidos de tetraspanina (TEMs) los cuales son proteínas que contienen dominios transmembranas y son capaces de interactuar con otras proteínas transmembranas; los TEMs están implicados en procesos de adhesión, migración, formación de la sinapsis así como en la endocitosis y exocitosis (Letian y col., 2010); ver figura 6.

furina, dejando así un complejo L2/genoma en el citosol, el cual posteriormente puede interactuar con la Sintaxina 18, la cual transporta el complejo a un sitio perinuclear (Conway y col., 2009).

Si bien se ha establecido que el tráfico de las vesículas a través de la célula se realiza a través de los microtúbulos, los mismos también pueden ser necesarios para el ingreso del genoma viral al núcleo. El transporte citoplasmático a través de los microtúbulos es mediado por un complejo de proteínas que utilizan la energía celular para el movimiento. Investigaciones previas han demostrado que la proteína L2 de VPH 16 y VPH 33 interactúa con la red de microtúbulos mediante el motor proteico de dineina durante la entrada de la infección a la célula. También se ha demostrado que los 40 aminoácidos del extremo C-terminal de L2 son esenciales para la interacción con el complejo de dineina, de igual manera, la proteína L2 alberga dos péptidos terminales que funcionan como señales de localización nuclear. Se ha sugerido que se requiere la ruptura de la envoltura nuclear para el establecimiento de la infección por VPH 16. L2 y el genoma viral se colocan en los dominios nucleares ND10 (también conocidos como cuerpos nucleares de leucemia promielocítica, cuerpos nucleares o dominios oncogénicos promielocíticos) después de la infección, lo que sugiere que ellos son translocados al núcleo como un complejo. Los dominios promielocíticos son pequeñas acumulaciones de numerosas proteínas, y muchos virus se unen a estos cuerpos para proteger el genoma de degradaciones por factores externos así como para la eficiente transcripción del genoma (Sapp y col., 2009) (Day y col., 2004).

Una vez que el virus entró en la célula se activa el promotor ubicado aguas arriba de la región reguladora que inicia la transcripción de las proteínas tempranas. Dos de ellas, E1 y E2 dirigen los factores de replicación de la célula hospedadora al origen de replicación viral, lo que resulta en un rápido aumento de copias del genoma viral por célula debido a que E2 es un activador transcripcional que cumple un rol auxiliar durante la iniciación de la replicación del ADN; las proteínas E1 y E2 forman un complejo en el origen viral ubicado en el LCR, acto seguido por el reclutamiento del segundo dímero de E1 y se libera E2 en un

proceso ATP dependiente y reclutan la polimerasas celulares y las proteínas accesorias necesarias para facilitar la replicación (Kadaja y col., 2009) (Conway y col., 2009).

Luego el tetrámero de E1 es convertido en copias de dobles trímeros (DT), en el cual las moléculas de E1 son posicionadas en un arreglo helicoidal en el ADNdb. El doble trímero es por sí mismo un precursor de la formación del hexámero doble de E1 activo (DH), el cual va acompañado por la transición del arreglo helicoidal a una estructura en anillo sin disociación de los contactos E1-ADN. Se sabe que la formación del doble trímero es muy rápida comparada con la subsecuente formación del doble hexámero (Kadaja y col., 2009).

El ciclo de replicación en el epitelio puede ser dividido en dos partes; primero, el genoma viral es replicado hasta más o menos 100 copias y es mantenido durante diferentes periodos de tiempo; las proteínas virales E1 y E2 son esenciales para esta replicación basal de ADN (Muñoz y col. 2006), ellas ayudan a establecer entre 20 y 100 copias episomales por célula basal (Conway y col. 2009) éste es un proceso que ocurre de manera rápida y transitoria, después de la cual el ADN viral es mantenido de manera estable en un número de copias del genoma casi constante durante las subsecuentes divisiones celulares (Kadaja y col., 2009). Segundo, una vez que las células basales son empujadas al compartimento suprabasal, ellas pierden su habilidad para dividirse y prefieren iniciar el programa de diferenciación terminal. Los papilomavirus se replican en este compartimento y para ser liberadas en este entorno, toman ventaja de la desintegración de las células epiteliales que ocurren como consecuencia del desplazamiento en las capas superficiales (Muñoz y col., 2006).

En una infección, la transcripción de los genes tempranos es activada primariamente por factores de transcripción celular que se unen a secuencias en el LCR. A bajas concentraciones E2 promueve la activación de la expresión de los genes tempranos, mientras que a elevadas concentraciones la reprime debido a que interfiere con la unión de factores de transcripción tales como TFIID y Sp1 para el reconocimiento de secuencias. Esta regulación de la expresión viral contribuye al control del número de copias en las células indiferenciadas. En la diferenciación ocurre la activación del promotor tardío, el

cual no es reprimido por E2, lo que resulta en un incremento en la expresión de E1 y E2 y conlleva a la amplificación del ADN viral (Longworth y col. 2004).

Durante la fase de amplificación, los viriones son empaquetados antes de ser liberados. Las células infectadas adquieren una morfología distinta y se denominan coilocitos, los cuales tienen un núcleo agrandado y múltiples núcleos por célula. La activación del promotor dependiente de diferenciación tardía conlleva al incremento de la expresión de las proteínas E1, E4 y E5. L1 y L2 también son expresadas en las capas superiores del epitelio (Abdul y col., 2009).

Una vez que se han replicado los papilomavirus y se encuentran en forma episomal en las células, deben asegurar igual segregación en genomas extracromosomales en las células hijas durante la división celular; este proceso es mediado por la proteína E2 y su unión en sitios ubicados en el LCR conocidos como elementos de mantenimiento de minicromosomas (MME); tanto MME como E2 son responsables del anclaje del genoma completo de papilomavirus como un plásmido en la región LCR en los cromosomas de las células hijas (Kadaja y col., 2009).

Como cada célula basal está infectada con el virus, cada célula hija está repleta de genomas virales que son igualmente repartidos durante la mitosis, posterior a la cual, una célula infectada permanece unida a la capa basal mientras que las otras células se desprenden y empiezan a migrar a las capas suprabasales. Durante la migración a través de los estratos, las células comienzan un proceso de diferenciación terminal; en el epitelio no infectado por el virus, las células normales salen del ciclo celular una vez que ellas se desprenden de la capa basal y además se caracterizan por la pérdida de núcleo en las células suprabasales diferenciadas (Conway y col., 2009).

En el caso del epitelio infectado por VPH, las células desprendidas permanecen activas mitóticamente debido a las propiedades oncogénicas de la proteína E7. Debido a esto, las células infectadas que están casi diferenciadas totalmente pueden volver a entrar a la fase S y mejorar la expresión de los factores de replicación celular que son requeridos para la amplificación concomitante del genoma viral y la expresión de los genes tardíos. Mientras

que las proteínas tempranas, E1^{E4} y E5 son traducidas en un proceso dependiente de diferenciación, éstas podrían afectar la replicación del genoma viral a través de la inhibición de la transición de G2 a M y estimular la progresión del ciclo celular respectivamente, del mismo modo son expresadas las proteínas L1 y L2. Una vez expresadas las proteínas de la cápside, se ensamblan en cápsulas icosaédricas con asistencia de las proteínas chaperonas (Conway y col., 2009).

La etapa final en el ciclo productivo del papilomavirus requiere que el genoma replicado sea empaquetado dentro de partículas infecciosas. Las proteínas de la cápside (L1 y L2) se acumulan después del comienzo de la amplificación del genoma con la expresión de L2 precediendo la expresión de L1. Los eventos que relacionan la amplificación del genoma con la síntesis de las proteínas de la cápside dependen de cambios mediante el empalme del ARNm y de la generación de transcritos que terminan en el sitio de poliadenilación tardía (Doorbar, 2006).

El ensamblaje de los viriones infecciosos en las capas superficiales requiere de E2 además de las proteínas L1 y L2. L1 se ensambla en capsómeros en el citoplasma previo a la relocalización nuclear y su reclutamiento en el componente Sp de los cuerpos promielocíticos. El ensamblaje de las partículas virales requiere la presencia de la proteína celular Hsp70, la cual también está implicada en el reciclaje de la proteína E1 durante la replicación (Doorbar, 2006).

Los antígenos de papilomavirus son retenidos hasta que las células infectadas son expuestas en la superficie epitelial y esto limita la habilidad del sistema inmune para detectar la infección (Doorbar, 2006).

En el epitelio estratificado, las proteínas E1^{E4} interactúan con el entramado de queratina celular causando un colapso, lo que permite que los viriones escapen de las células del epitelio (Conway y col. 2009) Ver figura 7.

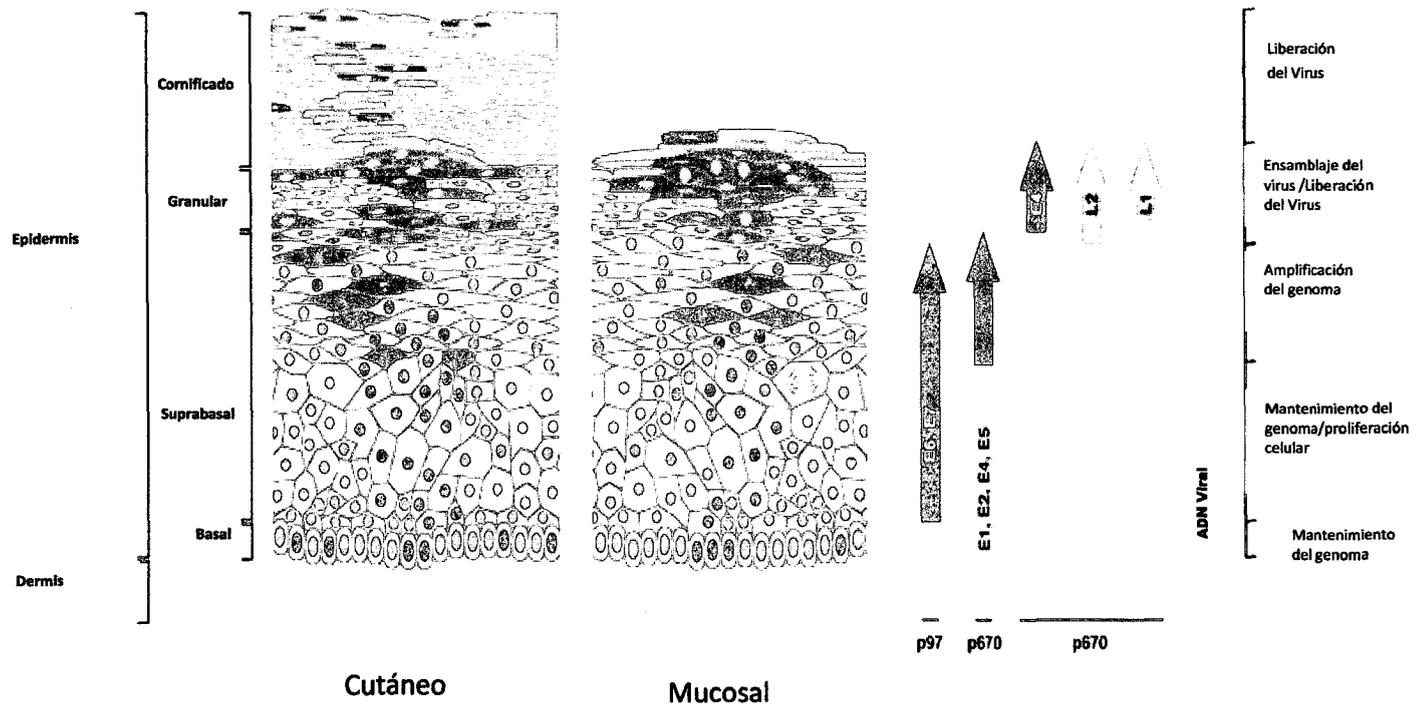


Figura 7: Los principales eventos que se producen tras infección aparecen en el diagrama a la izquierda. La epidermis se muestra en color con la dermis subyacente, la cual se muestra en gris. Las capas de diferentes células presentes en el epitelio se indican en la parte izquierda. Las células en la epidermis que expresan los marcadores de ciclo celular se muestran con núcleos rojos. La expresión de las proteínas virales necesarias para la replicación del genoma ocurre en las células que expresan E6 y E7 seguido de la activación de p670 en las capas epiteliales superiores (células mostradas en verde con núcleo rojo). Los genes L1 y L2 (amarillo) son expresados en un grupo de células que contienen el ADN amplificado en el epitelio superficial (Doorbar, 2006).

En células infectadas por VPH, el genoma del virus que normalmente está en forma episomal a menudo se integra en el genoma del hospedador. Estos eventos de integración aleatorios mantienen intactos los oncogenes E6 y E7 para continuar expresándose, mientras que la proteína E5 no se expresa usualmente en las células transformadas. Cabe acotar que la integración no es una parte normal del ciclo de vida del virus y por tanto hace imposible que el mismo complete su ciclo de vida; las formas episomales e integradas del virus pueden coexistir durante la fase temprana de tumorigénesis, mientras que en las etapas tardías, la forma episomal es menos común, sin embargo, continúa el incremento en la expresión de las proteínas E6 y E7, esto se debe en parte al incremento de la estabilidad en los transcritos de ARNm de los genomas integrados (Abdul y col., 2009).

La integración ocurre en diferentes sitios dentro del genoma del hospedador, pero se ha demostrado que la integración preferencial ocurre en sitios frágiles del cromosoma del hospedador mientras que la ruptura del genoma del virus ocurre en el gen E2; esto hace que se pierda la expresión de E2 y por tanto la regulación de la expresión de E6 y E7; aunque se ha demostrado que la ruptura del genoma viral también puede ocurrir en el gen E1; la ruptura del marco de lectura de E2 conlleva a la pérdida de la expresión de la proteína E2 y se pierde la represión de los promotores tempranos (p105 y p97 en VPH 18 y 16 respectivamente) lo cual regula la expresión de E6 y E7. La represión de estos promotores restaura las funciones normales de pRb y p53 así como otros blancos de E6 y E7 (Abdul y col., 2009) Ver figura 8.

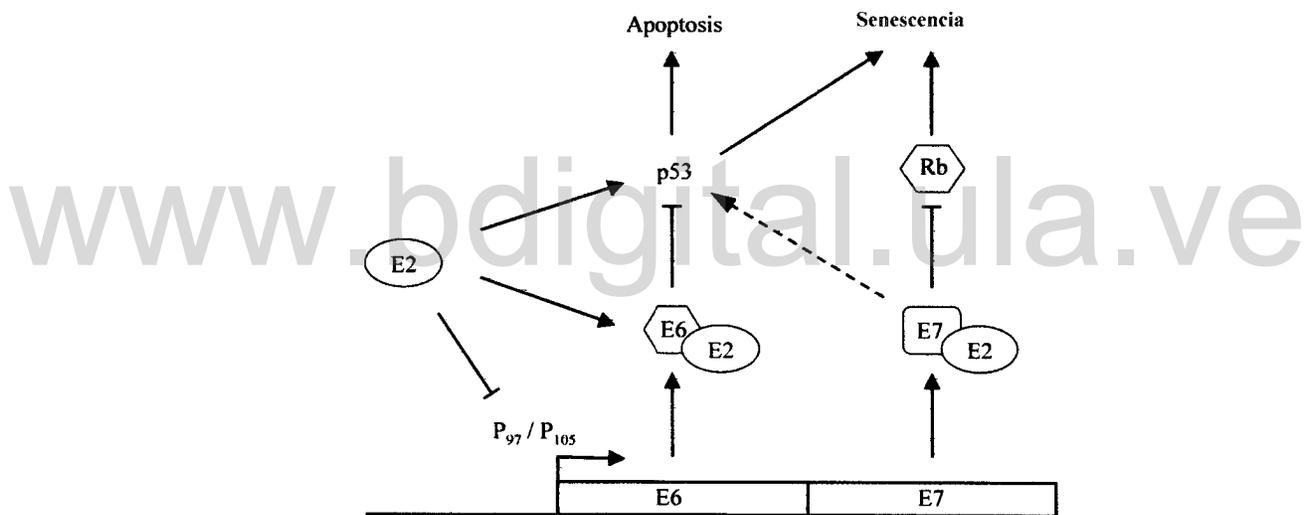


Figura 8. E2 influye en la apoptosis y en la senescencia celular mediante múltiples vías. E2 reprime la expresión de los genes de VPH e indirectamente modula la apoptosis y senescencia celular mediante la expresión de los niveles de E6 y E7. E2 también interactúa directamente con E6, E7 y p53 para influir en la apoptosis y senescencia (Abdul y col., 2009).

Las células con genomas de VPH integrados presentan un incremento en la proliferación y presentan inmortalización, lo que posteriormente puede conllevar a la aparición de carcinoma. Además, las proteínas E6 y E7 promueven la inestabilidad genética lo que lleva a la emergencia de carcinomas (Abdul y col., 2009).

La proteína E6 de los tipos de alto riesgo puede arrestar el ciclo celular mediante la degradación de la proteína p53 y así inactivar la vía de Mdm2. p53 está implicado en múltiples procesos incluyendo el ciclo de regulación celular, la inducción de apoptosis y la reparación del ADN. La vida media de p53 es muy corta, pero en respuesta al daño al ADN u otras alteraciones celulares p53 es estabilizada y las funciones de la proteína como factor de transcripción del ADN para inducir la expresión del inhibidor de ciclina dependiente de quinasa pR1 y una variedad de genes, resultando en el arresto de ciclo celular y/o apoptosis. P53 activado también induce la apoptosis por mecanismos independientes de la transcripción que implica la translocación de p53 a la mitocondria y la liberación del citocromo c. p53 puede inhibir la replicación del ADN del VPH a través de mecanismos que involucran E2. En células normales, la proteína Mdm2 controla los niveles de p53 por unión a ésta y actúa como ubiquitin ligasa. Mdm2 traslada p53 al núcleo del citoplasma por degradación por el proteasoma, a su vez, p53 activa la transcripción del gen Mdm2, lo que resulta en el mantenimiento de bajos niveles de p53 (Abdul y col., 2009).

Por otra parte, pRb en su forma hipofosforilada controla la transición de la fase G1 a S en el ciclo de vida debido a la unión a la familia E2F de factores de transcripción y reprimen la transcripción de los genes blanco de los factores E2F. En células normales, pRb está hipofosforilado en la etapa temprana de G1 y paulatinamente incrementa su fosforilación debido al complejo de ciclinas D/CDK4/6 hacia la fase S. Esto resulta en la liberación de las proteínas E2F las cuales luego activan la transcripción de los genes requeridos para la transición hacia la fase S. Las proteínas E7 de los tipos de alto riesgo anula este control normal del ciclo celular debido a que se une a pRb, liberando E2F. Las proteínas E7 de los tipos de alto riesgo también inducen la degradación de pRb mediante una vía dependiente de proteasoma, mientras que las E7 de los tipos de bajo riesgo no marcan a pRb para degradación. Una función de pRb es la represión de la transcripción del inhibidor de ciclina dependiente de quinasa p16 y E7 por consiguiente incrementa los niveles de p16. Sin embargo, aunque p16 normalmente inhibiría la ciclina D/CDK4 (y por tanto la fosforilación de pRb) para inducir el arresto del ciclo celular, esto no pasa debido a que las proteínas de los tipos de alto riesgo también remueve pRb (Abdul y col., 2009).

Las proteínas p130 y p107 también son blanco de las proteínas E2F. Aunque pRb participa en el control de la proliferación de las pluripotenciales, p107 y p130 están implicadas en la diferenciación celular. Tanto en los tipos de bajo como en los de alto riesgo la proteína E7 se une a p130 y la marcan para su degradación, es decir que la derregulación de p130 es requerida para la terminación del ciclo de vida viral en la célula infectada y su migración a través del epitelio. Sin embargo, solo las proteínas E7 de los tipos de alto riesgo marcan a p107 para su degradación lo que sugiere que esta proteína no es necesaria para completar el ciclo de vida viral (Abdul y col., 2009).

En el cáncer invasivo y lesiones precancerosas asociadas a infección por VPH de alto riesgo, se caracterizan por la integración del ADN viral en los cromosomas celulares. La integración del ADN viral está asociada a pérdidas de grandes segmentos del genoma viral, pero con la presencia intacta de las proteínas E6 y E7 y con la transcripción de la secuencia aguas abajo del LCR integrado. La interrupción de los genes E1 y E2 así como las secuencias aguas abajo podrían permitir niveles elevados en la transcripción de E6 y E7, cuyos ARNs son estabilizados por las secuencias celulares que se encuentran aguas debajo de la secuencia viral integrada (Barzon y col., 2008). Asimismo las células con genoma de VPH integrado muestran proliferación incrementada y forman un grupo de células inmortalizadas con numerosas mutaciones que conllevan a la transformación y formación de carcinomas (Abdul y col., 2009) (Longworth y col., 2004).

Las condiciones pre cancerosas del cérvix son clasificadas de acuerdo al incremento en la severidad de lesiones escamosas. Cabe acotar que la historia natural del cáncer inicia con la aparición de neoplasia intraepitelial I (NIC I) para luego avanzar a grados más severos como NIC II y lesiones microinvasivas (NIC III) para finalmente convertirse en una enfermedad invasiva, aunque algunos investigadores han sugerido que NIC I es un proceso distinto de NIC II y NIC III, y señalan que NIC I es una lesión autolimitada mientras que NIC II y NIC III son los verdaderos precursores de cáncer cervical, sin embargo, todos concluyen en que VPH es el precursor común (Burd y col., 2003).

- **Métodos de Detección para VPH**

El primer método para la detección de las lesiones del cuello uterino fue la colposcopia (Burd y col., 2003). La colposcopia es un método de exploración creado por el Dr. Hinselmann en 1928, la misma se basa en la observación del cérvix a través de un espéculo vaginal, obteniéndose imágenes aumentadas hasta 20 veces; estas imágenes simples de colposcopia se han enriquecido utilizando solución yodurada, ácido acético al 3% y nitrato de plata al 5%. Asimismo, en la actualidad se considera las biopsias tomadas de la zona de transformación detectada mediante colposcopia como prueba de oro o “Gold Standart” (Graham J. 1959) (Pretorius y col., 2007).

Otra técnica para la detección de los VPH de alto riesgo fue la tinción de Papanicolaou, dicho método fue introducido en 1949 por el Dr. George Papanicolaou con la finalidad de convertirlo en parte de la evaluación ginecológica rutinaria aun cuando no se conocía la relación entre el virus y el cáncer; durante mucho tiempo dicho método se consideró como el más efectivo para reducir la incidencia y muerte por cáncer cervical, sin embargo, con el paso de los años se determinó que este método reporta hasta un 20 a 30% de falsos negativos y probablemente el error humano es la primera causa de la variación de la precisión de la técnica ya que en promedio, un extendido celular Pap contiene entre 50.000 y 300.000 células que deben ser examinadas, aunque otros autores reportan que los falsos negativos pueden alcanzar el 40% (Curiel y col. 1999); en la tinción Pap se busca la presencia de hiperplasia epitelial y vacuolización citoplasmática degenerativa denominada coilocitosis (Burd y col., 2003) (Clinical Standart Inst.).

Las técnicas deben tener la sensibilidad y especificidad necesarias, además de una buena reproducibilidad, para considerarlas óptimas y aplicarlas en la detección del VPH en la práctica clínica. Los métodos de PCR basados en la amplificación de ADN de VPH poseen una alta sensibilidad para la detección del virus en muestras cervicovaginales (Cañadas y col. 2006), sin embargo, reportes previos han encontrado una baja prevalencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) de VPH en muestras uretrales, tanto en individuos con condilomas clínicos externos, como sin lesiones (Leyva y col. 2003).

Muchos métodos moleculares para la detección de VPH se utilizan actualmente, uno de ellos es la captura de híbridos en un método aprobado por la FDA (Administración de Comidas y Alimentos de Estados Unidos) para uso clínico, este método se utiliza como método de tamiz para diferenciar entre la presencia de VPH de alto riesgo o de bajo riesgo sin informar sobre el genotipo viral específico (Vernon y col. 2000) (Aedo y col., 2007).

Por su parte, la amplificación de genomas de VPH es la técnica más sensible ya que puede detectar entre 5 y 100 moléculas de ADN en un espécimen. El sistema de amplificación más utilizado en los sistemas de detección de ADN viral en muestras clínicas está basado en los oligonucleótidos consenso MY09/MY11 y GP5+/GP6+ los cuales amplifican una región conservada de la proteína L1 (Shikova y col. 2009) (WHO, 2010).

Con respecto a MY09/MY11, estos oligonucleótidos fueron utilizados en la primera PCR consenso la cual fue descrita por Manos y col en 1989, dichos oligonucleótidos detectan por lo menos en un 90% el genoma viral y resulta en un amplificado de 450bp el cual permite su posterior análisis mediante el uso de enzimas de restricción, secuenciamiento y otras técnicas de biología molecular. Los oligonucleótidos degenerados MY09/MY11 han sido en muchos casos reemplazados por un grupo de 18 oligonucleótidos definidos como PGMY09/11, los cuales tienen mayor especificidad y sensibilidad. Otros oligonucleótidos también se han utilizado ampliamente como GP5+/GP6+ el cual produce un amplificado aproximado a 150pb y SPF10 el cual produce un amplificado de 65pb (Qu y col., 1997) (WHO, 2010).

Para el caso de los oligonucleótidos GP5+/6+, estos surgen como una modificación de los oligonucleótidos GP5/GP6, diseñados en 1990 por Snijder y col. en 1990, los cuales detectaban aproximadamente 39% de los genomas virales, sin embargo, de Roda y col en 1995 agregaron un codón que es altamente conservado entre un gran número de genotipos virales al extremo 3' de cada uno de los oligonucleótidos y con esto aumentó a 43% la capacidad de detección del método (de Roda y col. 1995).

Sin embargo, muchos estudios indican que un solo método o técnica para la detección de VPH puede subestimar la prevalencia real de VPH en cáncer cervical (Shikova y col.

2009). Por ello, Sotlar y col. (2004) realizaron una relación anidada a partir del amplificado obtenido de MY09/MY11 con GP5+/GP6+ y demostró tener mayor sensibilidad que cuando se realizan reacciones de PCR con los mismo oligonucleótidos en reacciones independientes, de hecho, la tasa de concordancia y sensibilidad fue de 98%, y algunos autores indican que esta reacción anidada puede utilizarse en los laboratorios para el diagnóstico de rutina de VPH y su posterior tipificación mediante reacción de secuenciamiento (Hang y col. 2007).

Para tipificar el virus se han desarrollado varios métodos, uno de ellos es a reacción en cadena de la polimerasa de Polimorfismo de Conformación de Cadena Sencilla (PCR-SSCP), el cual es un método ampliamente utilizado para la detección de mutaciones puntuales, para ello, secuencia de interés es amplificada mediante PCR y separadas en moléculas de hebras sencillas por electroforesis en un gel de policrilamida no desnaturizante.

Este método fue utilizado por primera vez en 1987 en un gel de de gradiente denaturalizante de poliacrilamida; el mismo presenta ventaja sobre la PCR-RFLP debido a que esta última solo puede distinguir el polimorfismo de cadena si dicho polimorfismo está presente en las secuencias que reconocen la enzima o la delección o inserción de una secuencia corta en la región detectada mientras que la PCR-SSCP permite evaluar el patrón de movilidad de las bandas de ADN simple banda y los polimorfismos y mutaciones puntuales se evidencian en la alteración de dicho patrón (Orita y col. 1987). Sin embargo, la sensibilidad y resolución de la PCR-SSCP puede ser influenciada por muchos parámetros incluyendo el tamaño y contenido de G-C del amplificado, temperatura del gel durante la electroforesis, composición del buffer, aditivos en el buffer como glicerol, composición y concentración de la matriz del gel así como la concentración de oligonucleótidos en el producto de PCR (Zhu y col. 2006).

Este método fue adaptado para la tipificación de HPV, permitiendo identificar, en una única reacción, un amplio espectro de HPV que infectan el tracto anogenital. Esto es posible debido a que los patrones de bandas obtenidos para cada tipo viral son específicos y las diferencias migratorias reproducibles (Picconni y col. 2000).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El virus de papiloma humano es el agente causal del cáncer de cervical, sin embargo, la detección temprana del virus puede prevenir que el mismo progrese a lesión cervical. Para el diagnóstico y tipificación viral se han desarrollado numerosas técnicas, siendo la PCR una de las más sensibles y aplicadas, para esto se han utilizado varias combinaciones de oligonucleótidos, uno de los más utilizados son MY09/MY11, que genera un amplificado de 450 pb de la región *L1* y el mismo puede ser digerido con enzimas de restricción y de esta manera tipificado el virus, sin embargo, en algunos casos la carga viral es muy baja y no puede ser detectada mediante el sistema MY09/MY11, debido a esto, varios investigadores han demostrado que el uso de una reacción anidada como GP5+/GP6+ a partir del primer amplificado aumenta la sensibilidad de la prueba, sin embargo, la longitud del producto de reacción es de aproximadamente 150 pb y la misma no permite la tipificación mediante el uso de enzimas de restricción, por ello, varios autores han utilizado el sistema GP5+/GP6+ mediante la técnica PCR-SSCP y han demostrado que la misma es confiable para la tipificación ya que los patrones de banda obtenidos son específicos para cada tipo viral y a su vez permite detectar mutaciones puntuales, sin embargo, la técnica es laboriosa y cada laboratorio debe optimizar la misma de manera individual ya que el resultado de ésta varían con pequeños cambios de temperatura, voltaje, potencia, concentración del gel, entre otros.

Tomando en cuenta todo lo anterior, se planteó estandarizar un sistema de PCR-SSCP de la región GP5+/GP6+ para definir el patrón migratorio de cada uno de los 17 tipos virales más comunes en el estado Mérida y de esta manera utilizar el sistema como una herramienta en la tipificación viral en el diagnóstico de rutina en LABIOMEX.

HIPÓTESIS

El sistema PCR-SSCP de la región GP5+/GP6+ es una técnica sensible la cual, una vez estandarizada puede permitir la tipificación de VPH debido a que los patrones migratorios intratipo serían diferentes.

www.bdigital.ula.ve

OBJETIVO GENERAL

Estandarizar un sistema de PCR-SSCP de la región GP5+/GP6+ del gen *L1* para aplicarlo como sistema diagnóstico de rutina para la tipificación del virus de papiloma humano (VPH) en el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Seleccionar muestras de pacientes que hayan sido diagnosticados con uno de los 17 tipos de VPH más frecuentes en el estado Mérida.
- Optimizar la técnica PCR-SSCP para la región GP5+/GP6+ del gen *L1*.
- Evaluar los patrones migratorios de los 17 tipos más frecuentes de VPH presentes en el estado Mérida.
- Comparar los patrones migratorios de los pacientes con respecto a los controles positivos.
- Secuenciar las muestras que presenten variación del patrón migratorio y comparar con la secuencia de los controles positivos.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Muestras Biológicas:**

Las muestras biológicas utilizadas en este trabajo se obtuvieron de manera aleatoria de pacientes que asistieron a consultas ginecológicas y urológicas tanto privadas como públicas así como de pacientes que asistieron a la consulta de los Centros Diagnóstico Integral de la Misión Barrio Adentro de la localidad de Tabay del municipio Santos Marquina del estado Mérida-Venezuela, con previo consentimiento escrito del paciente. Las mismas fueron obtenidas mediante cepillado tanto cervical como del surco balano-prepucial; para la selección de las muestras no se utilizó ningún sesgo clínico, etario o de género, solo se utilizaron aquellas muestras que habían sido diagnosticadas previamente como positivas mediante el sistema PCR MY09/MY11 y tipificadas según PCR-RFLP en el Laboratorio de Biología y Medicina Experimental de la Universidad de Los Andes - LABIOMEX

Las muestras, una vez que llegaron al laboratorio se almacenaron a 4°C hasta el momento de su procesamiento.

- **Extracción de ADN:**

Para la extracción de ADN de las muestras de pacientes se extrajeron las células epiteliales de los cepillos, añadiendo solución salina al 0,8 % y se incubó por 2 horas a 37° C, luego se retiró el hisopo o cepillo cervical, se centrifugó a alta velocidad durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante, se recuperó el pellet donde se encontraba las células (Quintero y col. 2008) (Marquez, 2009).

Para la extracción del material genético se utilizó el protocolo descrito por Blin y col. (1976) y modificado por Quintero y col. (2008). Al paquete celular se le añadió 400 µl de tampón de extracción (Tris-HCl 0,2 M pH 8; EDTA 0,025 M; NaCl 0,1 M; y SDS 0,2 %), proteinasa K 0,2 mg (20 mg/ml) y 20 µl de SDS 10 %. Se incubó toda la noche a 55° C. Posteriormente se añadió 100 µl de Chelex-100 al 5 % y se calentó por 10 minutos a 95° C

A continuación se añadió un volumen de fenol-cloroformo-isoamilalcohol (24:23:1) y se agitó en vórtex, a la fase acuosa separada se le añadieron dos volúmenes de etanol absoluto y 0,2 volúmenes de acetato de amonio 10 M. Se dejó precipitar el ADN por 48 horas a -20 °C, y se procedió a centrifugar para bajar el precipitado. El ADN se resuspendió en 50 µl de tampón TE 10 mM pH 8 y se almacenó a -20 °C hasta el momento de su uso.

Por otra parte se extrajo ADN plasmídico en el cual se encuentra clonada la región L1 de los VPH tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 70 y 81, los mismos se encuentran en pGEM-T Easy en la cepa de *Escherichia coli* JM109. Estas cepas se encontraban almacenadas en medio Luria Bertani suplementado con glicerol a -20 °C. (Fernández., 2009). Luego, de cada cepa bacteriana en medio líquido se tomó una alícuota y se sembró por agotamiento en medio Luria Bertani sólido suplementado con 100µg/ml de ampicilina y se incubó a 37 °C durante 12 horas.

La purificación de plásmido se realizó de acuerdo al protocolo de lisis alcalina con SDS descrito por Sambrook y col. (2001) con algunas modificaciones, para ello se tomó una colonia aislada de cada cepa y se incubó en una fiola de 50 ml con 5 ml de medio Luria Bertani líquido suplementado con 100µg/ml de ampicilina y se incubó durante 12 horas a 37 °C en agitación. Una vez transcurrido este tiempo, el contenido de la fiola se centrifugó durante 5 minutos a 5000 g, se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 500 µl de Solución I (50 mM de glucosa, 25 mM de Tris -HCl pH 8.0 y 10 mM de EDTA pH 8.0), se agregó 1 ml de solución II (0,2 N de NaOH y 1% de SDS), se mezcló por inversión y se agregó 750µl de Solución III (CH₃COONa 3M, CH₃COOH 11,5% v/v), se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 minutos a máxima velocidad y el sobrenadante se transfirió a un tubo estéril.

La solución contentiva del material genético se precipitó con dos volúmenes de etanol absoluto y se incubó durante 20 minutos a -20°C, luego se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante, se dejó evaporar completamente el etanol y el pellet se resuspendió en 50 µl de buffer TE 10mM pH8, se agregó 5 µl de ARNasa (20mg/ml) e incubó durante 30 minutos a 37 °C, luego se agregó proteinasa K (20 mg/ml) y

se incubó durante 30 minutos a 37 °C, posteriormente se inactivó la proteinasa K mediante incubación a 65 °C durante 30 minutos.

Se agregó 60 µl de fenol cloroformo-isoamiloalcohol (25:24:1), se mezcló mediante el uso de vórtex y posteriormente se centrifugó durante 3 minutos a máxima velocidad, luego se tomó la fase acuosa, se midió el volumen de la misma y se agregó dos volúmenes de etanol absoluto y 0,2 volúmenes de CH₃COONa y se incubó durante 20 minutos a -20 °C, se centrifugó durante 10 minutos a máxima velocidad, se descartó el sobrenadante, se dejó evaporar completamente el etanol y el pellet se resuspendió en 50 µl buffer TE 10 mM pH 8.

- **Cuantificación de ADN**

Se cuantificó el ADN tanto de las muestras como de los plásmidos utilizando el TECAM Infinite M200 mediante medición de la absorbancia a 260nm y 280nm de longitud de onda (Glasel, 1995). La lectura a 260 nm se utiliza para realizar la cuantificación de ADN, tomando en cuenta que:

1 unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 50 ng/µl

Por tanto, para calcular la concentración de ácido nucleico en una muestra se aplica la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración (ng/}\mu\text{l)} = \text{Absorbancia a 260 nm} \times 50 \text{ ng/}\mu\text{l} \times \text{Factor de dilución.}$$

Por otra parte, para estimar la pureza de una muestra de ácido nucleico se determina la relación de la Absorbancia a 260 nm y 280 nm.

$$\text{Pureza} = \text{Absorbancia a 260 nm} / \text{Absorbancia a 280 nm}$$

Una preparación pura de ácido nucleico debe presentar una relación de absorbancia 260nm/280nm de 1,8, valores menores indican contaminación con proteínas y valores mayores hasta 2 indican preparaciones altamente purificadas de ácido nucleico, mientras que valores mayores a 2 indican contaminaciones con fenol. Cabe indicar que ni por

espectrofotometría ni por corrida electroforética se puede diferenciar ADN de ARN (Rada y col., 1998) (Glasel J., 1995).

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados en esta investigación.

Sistema PCR	Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Longitud del fragmento (pb)	Referencia
MY09/MY11	MY11	GCMCAGGGWCATAAYAATGG	450	Bernard y col., 1994.
	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC		
GP5+/GP6+	GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACAC	150	De Roda y col. 1995
	GP6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC		

W: A ó T; Y: C ó T; R: A ó G; M: A ó C.

- **Evaluación de la Integridad del ADN plasmídico.**

Para evaluar la calidad e integridad del ADN plasmídico y confirmar la presencia del inserto de L1 de acuerdo a lo manifestado por Fernandez (2009), se realizó la detección mediante el sistema PCR MY09/MY11 utilizando los oligonucleótidos previamente mencionados. La reacción se realizó de acuerdo a la siguiente mezcla de reacción. Ver tabla 5:

Tabla 5: Componentes de la mezcla de reacción para la reacción PCR-MY09/MY11

Componentes	Concentración final
Tampón de PCR	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,2 mM
Oligonucleótido MY11	0,5µM
Oligonucleótido MY09	0,5 µM
ADN polimerasa	0,05 U/µl
Agua	Cantidad necesaria
ADN molde	1 µl
Volumen final	12 µl

El programa de amplificación constó de un paso de desnaturalización inicial a 94 °C, luego, un paso de desnaturalización dentro del ciclo a 94 °C durante 30 segundos, un paso de alineamiento a 55 °C durante 45 segundos seguido de un paso de extensión a 72 °C durante 45 segundos, este proceso se repite durante 35 ciclos a partir del paso de desnaturalización dentro del ciclo y finalmente un minuto de extensión final a 72°C.

Para confirmar la identidad de los amplificadores de acuerdo con los resultados de Fernández 2009, se procedió a realizar el análisis de los mismos con PCR-RFLP con el uso de la Enzima *HpyCH4V* de New England Biolabs ®. En la tabla 6 Se muestran los volúmenes de reacción utilizados.

Tabla 6: Componentes de la reacción de digestión.

Componentes	Concentración Final
Tampón 4	1X
Enzima <i>HpyCH4V</i>	0,001U
Agua	Cantidad suficiente
Muestra	3 µl
Volumen final = 10 µl	

Para la reacción de digestión se incubó durante dos horas a 37 °C y luego se inactivó la enzima durante 5 minutos a 65 °C de acuerdo a las especificaciones del fabricante (New England Biolabs., 2005).

- **Evaluación de la calidad e integridad del ADN de las muestras**

Para evaluar la calidad de las muestras de ADN se les realizó la reacción de PCR-MY09/MY11, e independientemente del resultado se realizó un PCR anidado con el sistema de PCR GP5+/GP6+, para el cual se utilizó la siguiente mezcla de reacción; ver tabla 7:

Tabla 7: Componentes de la mezcla de reacción para la reacción PCR-GP5+/GP6+

Componentes	Concentración final
Tampón de PCR	1X
MgCl ₂	2 mM
dNTPs	0,2 mM
Oligonucleótido GP5+	0,5µM
Oligonucleótido GP6+	0,5 µM
ADN polimerasa	0,05 U/µl
Agua	Cantidad necesaria
ADN molde	1 µl
Volumen final	12 µl

El programa de amplificación consta de los siguientes pasos: un paso de desnaturalización inicial a 94 °C durante dos minutos, un paso de desnaturalización durante el ciclo a 94 °C durante treinta segundos, un paso de alineamiento a 44 °C durante treinta segundos, un paso de extensión a 72 °C durante treinta segundos, este proceso se repite a partir del paso de desnaturalización dentro del ciclo treinta veces y luego un paso de extensión final a 72 °C durante un minuto.

- **Observación de los amplificadores y las digestiones:**

Los resultados de PCR y PCR-RFLP fueron vistos en geles de poliacrilamida horizontales al 6%, la mezcla para la preparación del gel se muestra en la tabla 8.

Tabla 8: Componentes de la mezcla de gel poliacrilamida al 6%

Componentes	Concentración final
Poliacrilamida (29:1)*	6%
Buffer TAE	0,5X
Persulfato de Amonio	0,3%
TEMED**	0,3%
Agua	Cantidad Necesaria
Volumen Final	25 ml

*: Poliacrilamida 29:1: 29% de acrilamida y 1% de bis-acrilamida. ** TEMED: Tetrametil etilendiamina.

Las muestras en los geles se corrieron a 120 Voltios, 80 miliamperios y 300 Watts.

- **Sistema PCR-SSCP**

Para este método se utilizó el instrumento de electroforesis Hoefer™ SE60 de Amershan Biosciences adaptado al enfriador Tempette® TE-8D Techne, con vidrios de 16 x18 cm, los cuales se lavaron con jabón neutro y se pulieron con etanol y papel de lente; posteriormente uno de los vidrios se limpió con una solución adherente “Binding Solution” (metacrilato de propil 3-trimetoxisilil Sigma® 2,3 µl, ácido acético glacial 2,3 µl y etanol absoluto 450 µl) la cual se aplicó al vidrio y se distribuyó rápidamente en toda la superficie utilizando papel de lente. Por su parte, el vidrio paralelo se preparó con 450 µl de Sigmacote (Sigma®) la cual es una silicona que forma una película microscópica en el vidrio, lo cual previene que el gel de adhiera a este (Han y col., 2003) y se distribuyó por toda la superficie del vidrio al igual que en el vidrio que adhiere el gel, luego se colocaron los vidrios de manera paralela, se colocaron los sujetadores y se ajustaron en el soporte.

Se preparó el gel de poliacrilamida al 12%. Su composición se muestra en la tabla 9:

Tabla 9: Componentes de la mezcla de gel poliacrilamida al 12%

Componente	Concentración Final
Poliacrilamida (39:1)	12%
Buffer TAE	0,5 X
Glicerol	0,05%
Persulfato de amonio	0,3%
TEMED	0,24%
Agua	20,533ml
Volumen Final	30 ml

La mezcla se vertió entre los dos vidrios, se colocó el peine, se dejó polimerizar durante 15 minutos, se retiró el peine y se lavaron los pozos con abundante agua deionizada con la ayuda de una jeringa.

Posteriormente en cada pozo se cargaron 10 µl de buffer denaturalizante, la cual contiene formamida al 95%, EDTA 20 mM, azul de bromofenol 0,05%, luego el sistema de vidrios se colocaron dentro de una cámara de electroforesis la cual contenía 6 litros de buffer TAE

0,5X a temperatura entre 4 y 6 °C, de acuerdo con Hayashi K., 1991, la temperatura óptima para la electroforesis de SSCP debe ser 4 °C y (Hayashi K., 1991), asimismo, grandes variaciones en la temperatura puede causar la aparición de artefactos en la corrida (Fujita y col., 1994). La precorrida durante 2 horas a 950 Voltios, 300 mA y 100 Watts durante dos horas; cabe acotar que se colocaron dos sistemas de vidrios de manera simultánea.

Concluida la precorrida se procedió a preparar las muestras para correrlas en el gel, las muestras utilizadas correspondían al amplificado de la región GP5+/GP6+ que se ubica dentro del marco de lectura de L1 (de Roda, 1995). Para la preparación de las muestras se mezclaron 6 µl de amplificado con 4 µl de buffer desnaturalizante, luego se incubó durante 10 minutos a 95 °C y de inmediato se enfriaron a 4 °C durante 10 minutos. Finalmente se cargó el contenido total en cada uno de los pozos; el primer pozo fue cargado con 0,8 µl de marcador de peso molecular (Low Molecular Weight DNA Ladder) (New England Biolabs., 2005), los pozos de cada uno de los extremos se cargaron con 10 µl buffer desnaturalizante. La corrida se realizó durante 2 horas y 15 minutos en las mismas condiciones de la precorrida.

Una vez concluida la corrida se despegaron los vidrios tratados con Sigmacote Promega ®, y los otros vidrios con el gel adherido se revelaron según el método propuesto por Bleider y col. (1982), modificado, para ello, cada vidrio se colocó en 400 ml de ácido acético glacial al 10% durante 12 horas, posteriormente se lavaron con abundante agua hasta eliminar completamente los restos de ácido acético y se colocaron en una solución compuesta por 250 ml de agua deionizada, 250 mg de nitrato de plata y 375 µl de formaldehído durante 30 minutos, en constante agitación y protegido de la luz (Beidler y col. 1982).

Para el revelado, los vidrios se lavaron durante 10 segundos con agua deionizada y se les aplicó 400 ml de una solución de carbonato de calcio (8g), formaldehído (750 µl) y tiosulfato de sodio al 10 % (100 µl). Los vidrios se mantuvieron en esta solución hasta observar la presencia de bandas y la reacción se detuvo agregándole 100 ml de ácido

acético glacial al 10%. Los resultados fueron observados en luz blanca y fotografiados para su posterior análisis.

- **PCR-RFLP para las muestras con patrones diferentes**

Aquellas muestras que presentaron variación en el patrón de bandas se les realizó una reacción anidada a partir del amplificado de la primera reacción utilizando los oligonucleótidos GP5+/MY09, la cual genera un amplificado aproximado de 410 pb y posteriormente se procedió a realizar PCR-RFLP con las enzimas *Dde I*, *Hae III* y *Rsa I* de la casa comercial New England Biolabs ® se utilizaron las mismas condiciones la Tabla 6.

Solo en aquellas muestras donde se demostró la presencia de un solo tipo de VPH de acuerdo al patrón de digestión se procedió a preparar las muestras para secuenciarlas.

- **Reacción de Secuenciamiento.**

Previo al secuenciamiento se realizó la purificación de los amplificados de GP5+/GP6+, para ello se obtuvo un amplificado de 100 µl de la región GP5+/GP6+, el cual fue corrido en gel de agarosa al 1% y posteriormente revelado en bromuro de etidio y la banda fue cortada mediante el uso de bisturí con la ayuda de luz ultravioleta; la banda fue pesada y purificada utilizando el kit de extracción Wizard® Genomic DNA Purification Kit de Promega ®. El ADN purificado fue resuspendido en 50 µl de agua deionizada y posteriormente cuantificado mediante espectrofotometría a 260 nm.

El secuenciamiento se realizó en el instrumento ABS Prism 310 Genetic Analyzer y se utilizó el Kit Big Dye Terminator. Para la reacción de secuenciamiento se utilizó la siguiente mezcla de reacción. Ver Tabla 10:

Tabla 10: Componentes de la mezcla de reacción para secuenciamiento.

Componente	Concentración final
Buffer	1X
Big Dye Terminator v 3.1	-
Oligonucleótido	5 pmol/ μ l
ADN molde	1000 ng
Agua deionizada	Cantidad Necesaria
Volúmen final	10 μl

El programa de amplificación constó de un paso de denaturalización a 96 °C durante 10 minutos, seguido de un paso de alineamiento a 54 °C durante 5 segundos y un paso de extensión a 60°C durante 4 minutos. El proceso se repitió durante 25 ciclos. La rampa fue de 30%.

Posteriormente a las muestras se les agregaron 80 μ l de isopropanol al 65%, se colocaron 30 segundos en vórtex y se centrifugaron durante 30 segundos a 12.000 g y se incubaron durante 20 minutos a temperatura ambiente; luego se centrifugaron durante 25 minutos a 12000 g y se descartó el sobrenadante, se es agregó 200 μ l de etanol al 60%, se colocaron 30 segundos en vórtex y se centrifugaron durante 5 minutos a 12.000 g y se descartó el sobrenadante, luego se evaporó el etanol de las muestras colocando los tubos con la tapa abierta a 65 °C y luego se colocaron a 37°C durante 12 horas; las muestras siempre se mantuvieron protegidas de la luz.

Posteriormente a las muestras se les agregó 15 μ l de Formamida Hi-Di, se incubaron durante 5 minutos a 95 °C y se enfriaron durante 5 minutos a 4 °C, se colocaron en la placa para secuenciar y se inició el proceso.

Las condiciones de secuenciamiento fueron las siguientes:

- Temperatura del horno: 50°C
- DyeSet/Primer: KB_310_POP4_BDTv3_36Std.mod.
- Módulo de Corrida: P4 StdSeq (1ml)E.md4.

RESULTADOS

• Cuantificación de la concentración de ADN

La cuantificación del ADN de los pacientes medida por espectrofotometría a 260 nm fue de 355,008 ng/ μ l y su pureza mediante la relación de absorbancia a 260nm y 280nm fue de 1,373; mientras que la concentración del ADN plasmídico fue de 669,625 ng/ μ l y su pureza de 1,627.

• Evaluación de la integridad del ADN plasmídico

Para evaluar la integridad del ADN plasmídico y confirmar la presencia del gen *L1* de los 17 tipos virales reportados por Fernandez (2009) se realizó la amplificación de la región MY09/MY11, la cual tiene una longitud aproximada de 450 pb utilizando los oligonucleótidos ya mencionados; ver Figura 9:



Figura 9: Amplificación de la región My09/MY11 de los tipos virales 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 70 y 81. CN: Control Negativo. M: Marcador de peso molecular (*Low Molecular Weight DNA Ladder* de New England Biolabs ®). Gel de poliacrilamida al 6%.

• Confirmación de la identidad de los tipos virales

Para confirmar la identidad del tipo viral presente en el ADN plasmídico se realizó la digestión con la enzima *HpyCH4V* y el resultado de la misma se comparó con lo determinado por Bernard y col. (1994); ver figura 10:

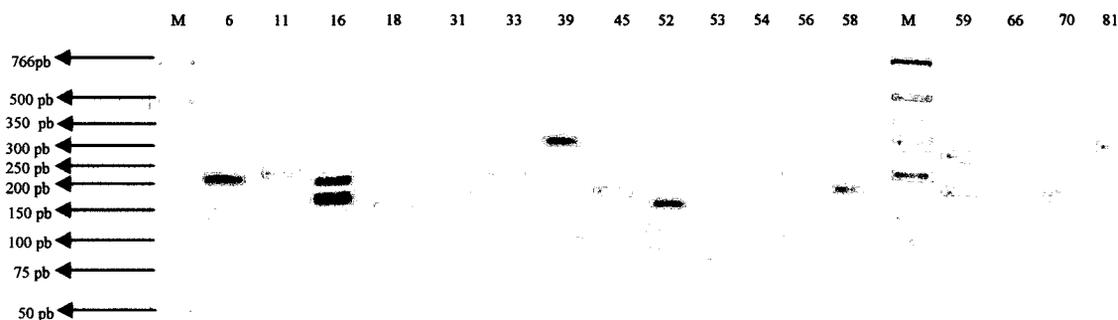


Figura 10: RFLP de los tipos virales presentes en el ADN plasmídico. M: Marcador de peso molecular. Gel de poliacrilamida al 6%.

- **Evaluación de la calidad e integridad del ADN de las muestras**

A todas las muestras se les realizó la reacción la amplificación de la región MY09/MY11 y posteriormente se les realizó la reacción anidada de la región GP5+/GP6+ (longitud aproximada de 150bp) sin tomar el cuenta el primer resultado de amplificación. Cabe acotar que el control positivo en todos los casos fue el amplificado de la región GP5+/GP6+ extraído del ADN plasmídico para cada tipo viral, mientras que el control negativo correspondió a la reacción sin ADN; el marcador de peso molecular utilizado *Low Molecular Weight DNA Ladder* de New England Biolabs ®; ver figuras: 11 a 20.



Figura 11: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 6; CN: Control Negativo, CP: Control Positivo, M: Marcador de peso molecular, Pozos 1 a 30: pacientes con VPH tipo 6. Gel de poliacrilamida al 6%.

CN CP M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Figura 12: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 11. CN: Control Negativo, CP: Control Positivo, M: Marcador de peso molecular, Pozos 1 a 19: pacientes con VPH tipo 11. Gel de poliacrilamida al 6%.

CN CP M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Figura 13: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 16. CN: Control Negativo, CP: Control Positivo, M: Marcador de peso molecular, Pozos 1 a 30: pacientes con VPH tipo 16. Gel de poliacrilamida al 6%.

CN CP M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30

Figura 14: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 18. CN: Control Negativo, CP: Control Positivo, M: Marcador de peso molecular, Pozos 1 a 30: pacientes con VPH tipo 18. Gel de poliacrilamida al 6%.

CN CP31 M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 CP33 M 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Figura 15: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 31 y 33. CN: Control Negativo, CP31: Control Positivo de VPH 31, CP33 Control Positivo de VPH 33, M: Marcador de peso molecular, Pozos 1 a 19: pacientes con VPH tipo 31, Pozos 20 a 28: pacientes con VPH tipo 33. Gel de poliacrilamida al 6%.

CN CP39 M 1 2 3 4 5 6 7 8 CP45 M 9 10 11

Figura 16: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 39 y 45. CN: Control Negativo, CP39: Control Positivo de VPH 39, CP 45: control positivo para VPH 45, M: Marcador de peso molecular, Pozos 1 a 8: pacientes con VPH tipo 39, Pozos 9 a 11: pacientes con VPH tipo 45. Gel de poliacrilamida al 6%.

CN CP52 M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 CP53 M 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Figura 17: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 52 y 53. CN: Control Negativo, CP 52: Control Positivo VPH 52, CP 53: Control positivo VPH 53, M: Marcador de peso molecular, Pozos 1 a 18: pacientes con VPH tipo 52, Pozos 19 a 28: pacientes con VPH tipo 53. Gel de poliacrilamida al 6%.

www.pdigital.ula.ve

CP54 CN M 1 2 3 4 5 6 7 CP56 M 8 9 10 11 12 13 CP58 CN M 14 15 16 17 18 19 20 21

Figura 18: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 54, 56 y 58. CN: Control Negativo, CP54: Control Positivo de VPH 54, CP 56: Control positivo de VPH 56, CP 58: Control Positivo de VPH 58, M: Marcador de peso molecular, Pozos 1 a 7: pacientes con VPH tipo 54. Gel de poliacrilamida al 6%.

CN CP59 M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 CP66 CN M 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

Figura 19: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 59 y 66. CN: Control Negativo, CP59: Control Positivo de VPH 59, CP66: Control Positivo de VPH 66, M: Marcador de peso molecular, Pozos 1 a 10: pacientes con VPH tipo 59, Pozos 11 a 28: pacientes con VPH tipo 66 Gel de poliacrilamida al 6%.

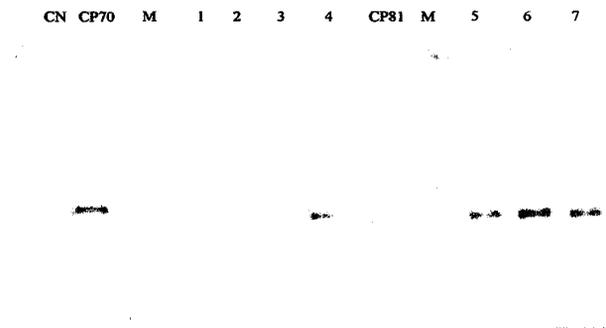


Figura 20: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para VPH 70 y 81. CN: Control Negativo, CP70: Control Positivo de VPH tipo 70, CP 81: control positivo de VPH 81, M: Marcador de peso molecular, Pozos 1 a 4: pacientes con VPH tipo 70, Pozos 5 a 7: pacientes con VPH tipo 81. Gel de poliacrilamida al 6%.

- **Polimorfismo de cadena sencilla (SSCP)**

Se realizó el análisis del polimorfismo de cadena sencilla de las muestras previamente mencionadas. Como patrón de referencia se utilizó la región GP5+/GP6+ del ADN plasmídico para cada tipo viral.

- **VPH tipo 6:**

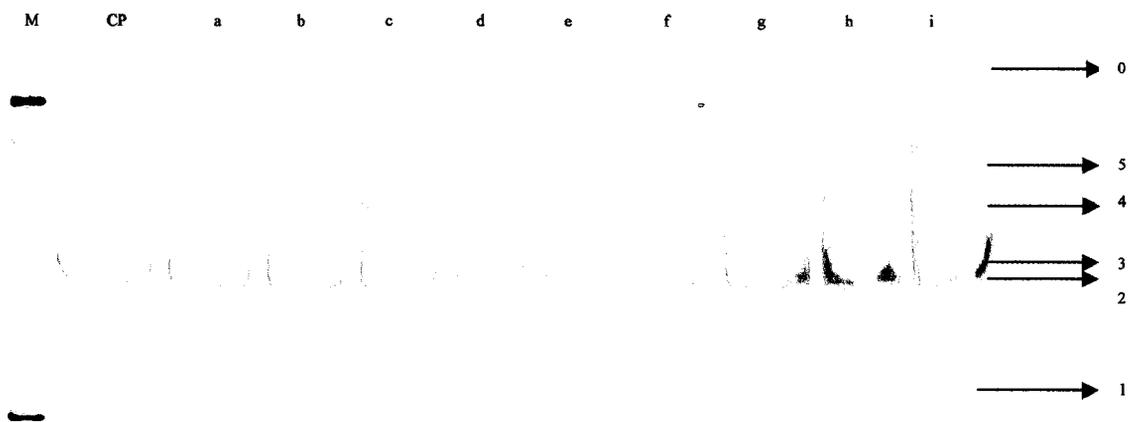


Figura 21: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 6. M: Marcador de peso molecular, CP: Control Positivo, Pozos "a" a "i": pacientes con VPH tipo 6. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 21 se observa la presencia de cinco bandas, el factor de migración electroforético (FME) con respecto al punto "0" fueron: para la banda 1 fue de 4,1; para la

banda 2 fue de 2,8; para la banda 3 fue de 2,5; para la banda 4 fue de 1,8 y para la banda 5 fue de 1,1.

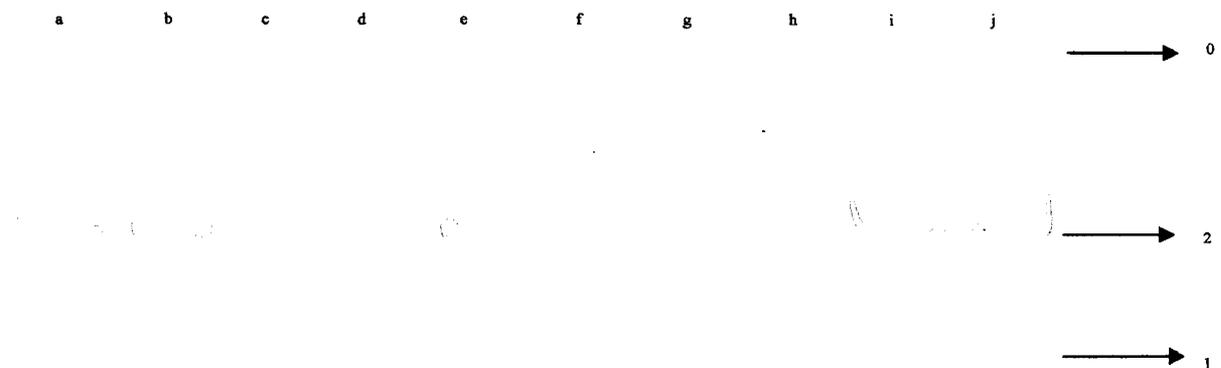


Figura 22: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 6. Pozos “a” a “j”: pacientes con VPH tipo 6. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 22 se observa la presencia de dos bandas, el FME de la banda 1 fue de 4, mientras que para la banda 2 fue 2,4.

www.bdigital.ula.ve



Figura 23: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 6. M: Marcador de peso molecular, Pozos “a” a “h”: pacientes con VPH tipo 6. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 23 se observa la presencia de tres bandas, el FME de la banda 1 fue 4,1, de la banda 2 de 2,2 y de la banda 3 de 2,0. En los tres geles que se realizaron para evaluar el patrón de movilidad electroforética para VPH 6 se observa una leve diferencia en los FME, lo cual se debe probablemente a variación de la potencia en las corridas ya que era éste el

único parámetro no controlable; asimismo, las bandas comunes en todos los geles fueron la N° 1 y N° 2, y esto posiblemente se deba a variaciones en la tinción que impide observar la presencia de las otras bandas.

▪ **VPH tipo 11**

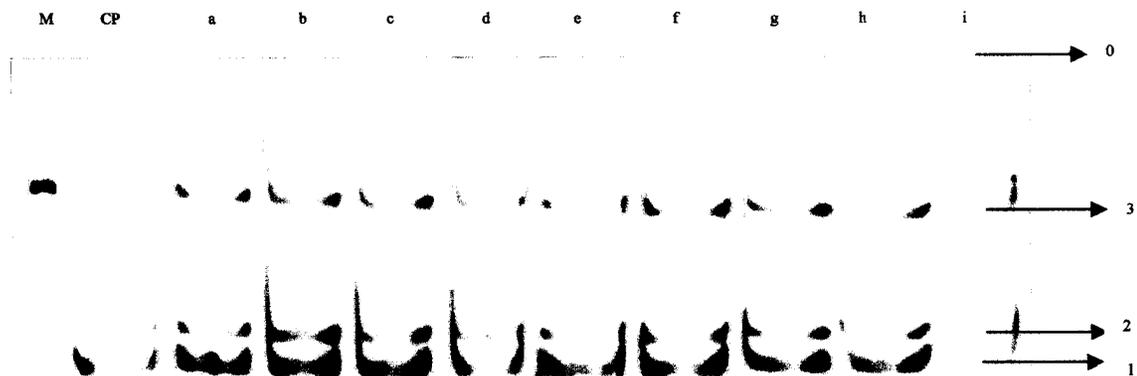


Figura 24: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 11. M: Marcador de peso molecular. CP: control positivo, Pozos “a” a “i”: pacientes con VPH tipo 11. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 24 se observa la presencia de tres bandas, el FME para la banda 1 fue de 4,2, para la banda 2 fue de 3,7 y para la banda 3 fue de 2,1.

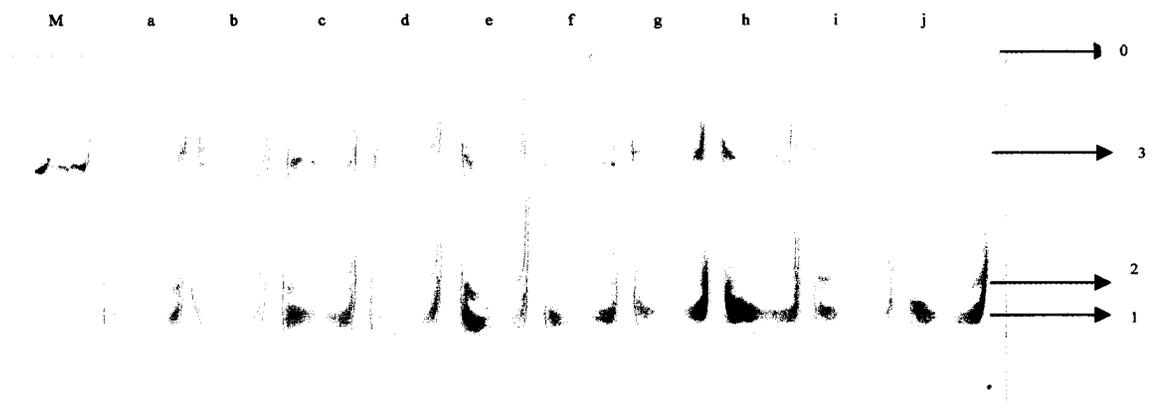


Figura 25: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 11. M: Marcador de peso molecular. Pozos “a” a “j”: pacientes con VPH tipo 11. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 25 se observa la presencia de tres bandas, el FME de la banda 1 fue de 3,6, de la banda 2 fue de 3,1 cm y de la banda 3 fue de 1,9.

▪ VPH Tipo 16

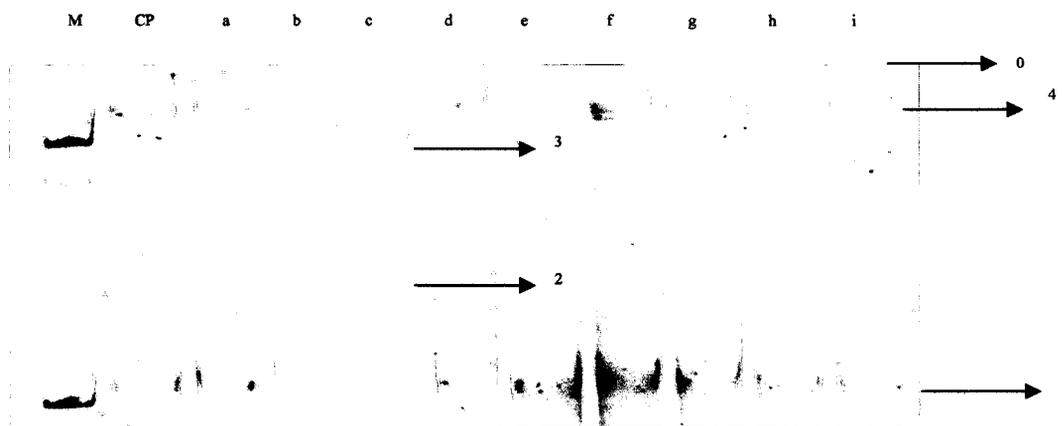


Figura 26: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 16. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "i": pacientes con VPH tipo 16. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 26 se observa la presencia de dos bandas (1 y 4) en los pozos correspondientes al CP, a, d, e, f., g, h, i el FME de la banda 1 fue de 4,3; de la banda 4 fue de 0,7; mientras que en los pozos b y c se observaron dos bandas (2 y 3), cuyos FME fueron 2,9 y 1,1; estos dos pozos correspondieron a los pacientes N° 4110 y 4274 respectivamente.

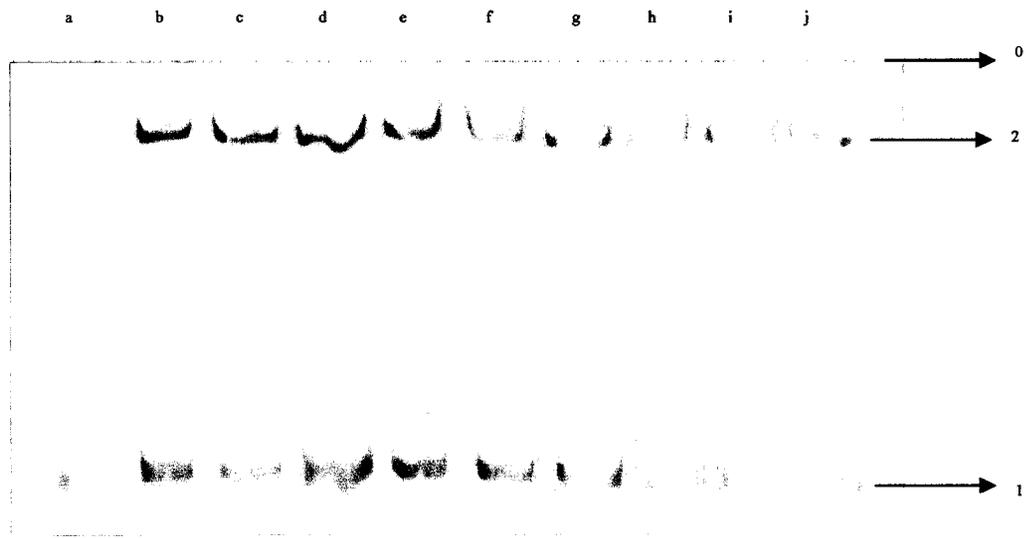


Figura 27: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 16. Pozos “a” a “j”: pacientes con VPH tipo 16. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 27 se observa la presencia de tres bandas, el FME de la banda 1 fue de 5,6 y de la banda 2 fue de 1,1.

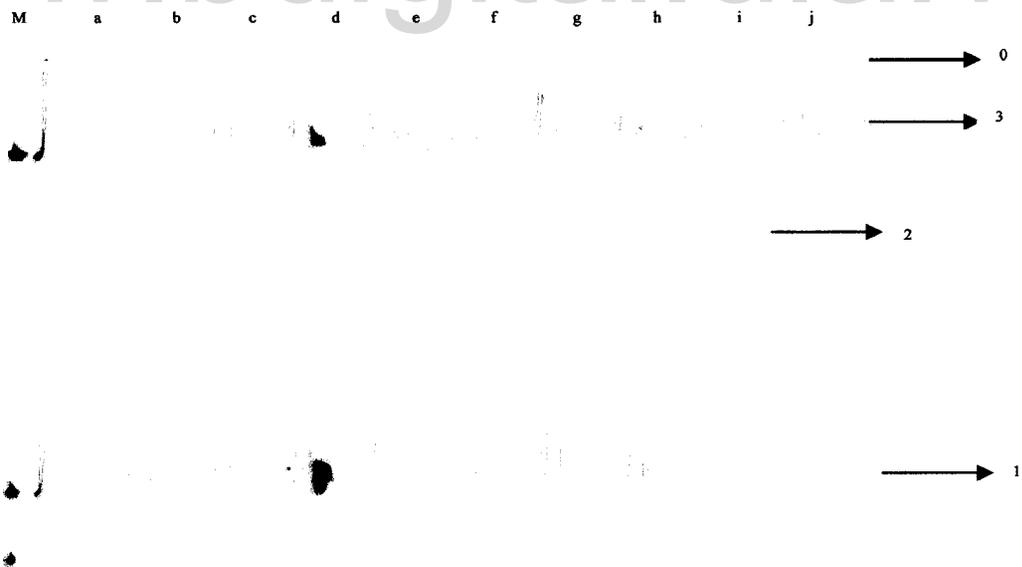


Figura 28: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 16. Pozos “a” a “j”: pacientes con VPH tipo 16. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 28, en todos los pozos se observa la presencia de dos bandas (1 y 3), el FME de la banda 1 fue de 5,5 y de la banda 3 fue de 1,0; en el pozo i se observa la presencia de una tercera banda (2), la cual tiene un FME de 2,3, el pozo 9 corresponde al paciente N° 3213.

▪ VPH Tipo 18

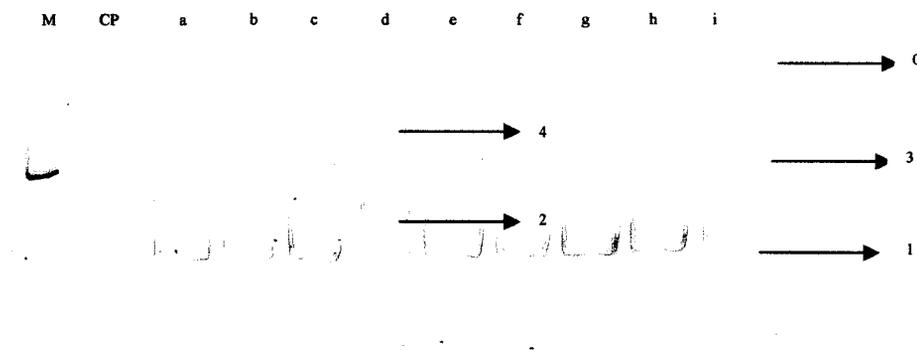


Figura 29: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 18. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "i": pacientes con VPH tipo 18. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 29 se observa que en todos los pozos está presente la banda 1, la cual tiene un FME de 2,9; en el pozo "d" (paciente N° 4258) existen otras dos bandas (2 y 4), cuyos FME son de 2,3 y 1 respectivamente mientras que en el resto de los pozos se observa la banda 3, las cuales tienen un FME de 1,6.



Figura 30: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 18. M: Marcador de peso molecular, Pozos "a" a "j": pacientes con VPH tipo 18. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 30 en todos los pozos se observa la presencia de dos bandas (1 y 2), el FME de la banda 1 fue de 2,4 y de la banda 2 fue de 1,3.

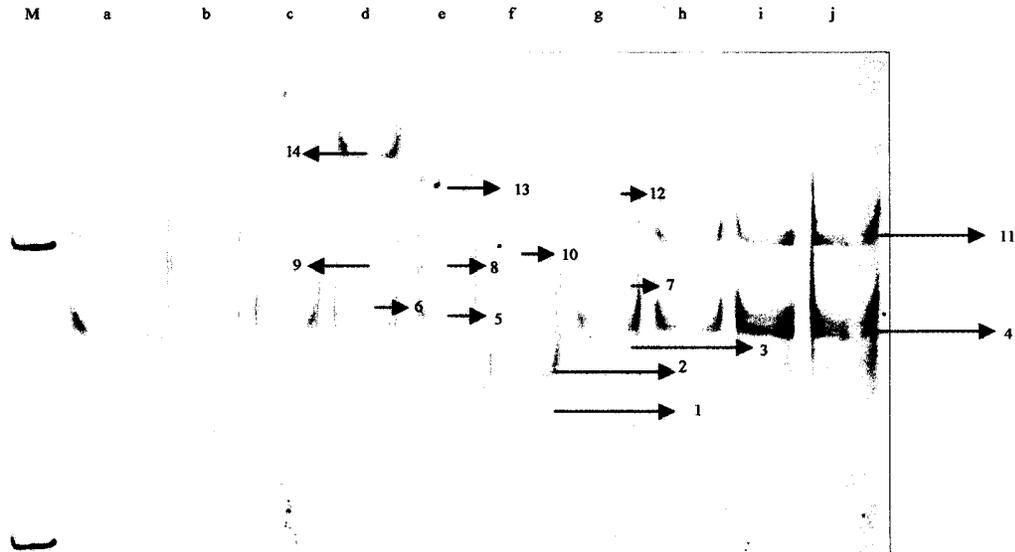


Figura 31: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 18. M: Marcador de peso molecular, Pozos "a" a "j": pacientes con VPH tipo 18. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 31, en los pozos "a, b, c, g, h, i, j" se observa la presencia de dos bandas (N° 4 y 11), las cuales presentaron un FME de 3,7 y 2,5 respectivamente, la banda N°4 también está presente en los pozos "d" y "g", asimismo, en pozo "d" se observa la banda N° 6, 9 y 14, las cual tienen un FME de 3,4, 2,8 y 1,3 respectivamente; por su parte, en el pozo "e" se presentan 3 bandas (N° 5, 8 y 13) cuyos FME son 3,5, 3,0 y 1,8 respectivamente. El pozo "f" presenta 3 bandas (N° 1, 2 y 10) con FME de 4,7, 4,3 y 2,7; por su parte, el pozo "g" se observan las bandas 4, 3, 7 y 12, los FME de las tres últimas son 3,9, 3,0 y 1,9 respectivamente; el pozo "d" corresponde al paciente: 06827, el pozo "e" corresponde al paciente 09556, el pozo "f" corresponde al paciente 2945, el pozo "g" corresponde al paciente 4125.

▪ **VPH Tipo 31**



Figura 32: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 31. M: Marcador de peso molecular, CP: Control positivo, Pozos “a” a “i”: pacientes con VPH tipo 31. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 32, en todos los pozos se observa la presencia de cuatro bandas (1, 2, 3 y 4), el FME de la banda 1 fue de 2,7; de la banda 2 fue de 2,5; de la banda 3 fue de 2,3 y de la banda 4 fue de 1,1.

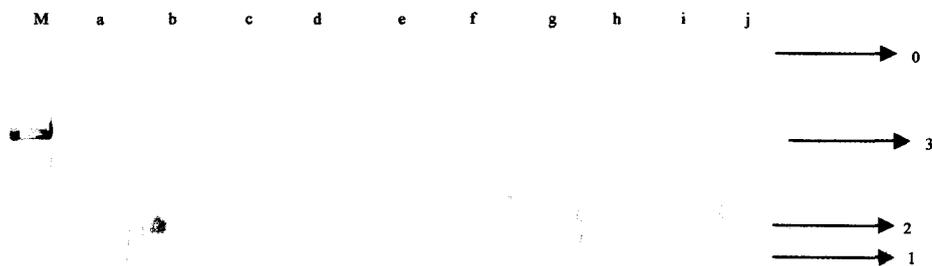


Figura 33: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 31. M: Marcador de peso molecular, Pozos “a” a “j”: pacientes con VPH tipo 31. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 33 en todos los pozos se observa la presencia de tres bandas (1, 2 y 3), el FME de la banda 1 fue de 2,8; de la banda 2 fue de 2,3 y de la banda 3 fue de 1,1 cm; sin embargo, entre las bandas 1 y 2 hay otra banda que no se tomó en cuenta para medir su distancia debido a que la misma es difusa.

■ VPH Tipo 33

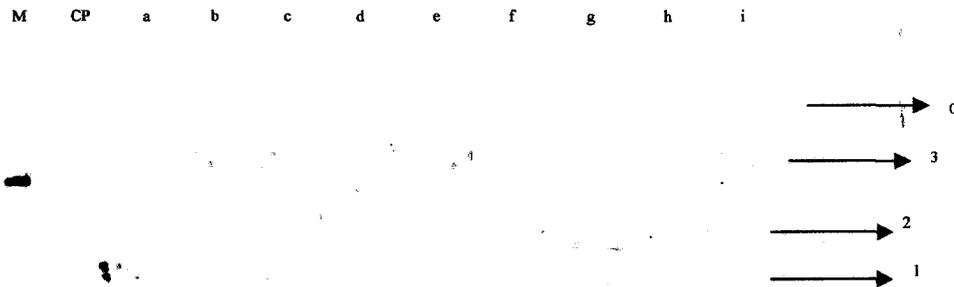


Figura 34: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 33. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "i": pacientes con VPH tipo 33. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 34 en todos los pozos se observa la presencia de tres bandas (1, 2 y 3), el FME de la banda 1 fue de 2,2; de la banda 2 fue de 1,7 y de la banda 3 fue de 0,7.

■ VPH Tipo 39

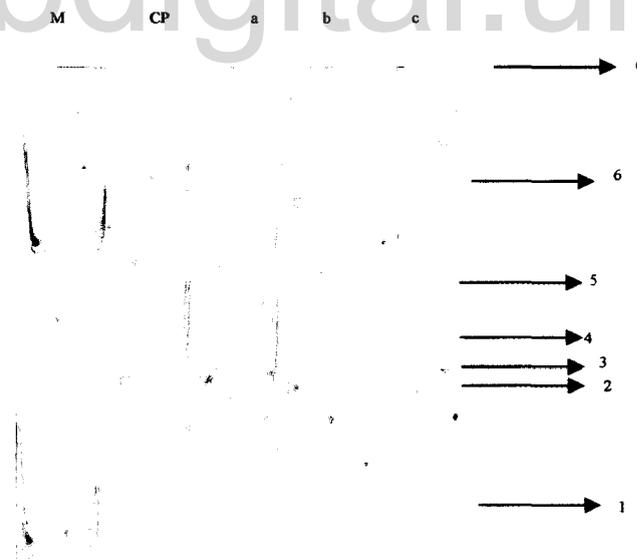


Figura 35: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 39. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "c": pacientes con VPH tipo 39. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 35 en todos los pozos se observa la presencia de seis bandas, el FME de la banda 1 fue de 5,7; de la banda 2 fue de 4,1; de la banda 3 fue de 3,8; de la banda 4 fue de 3,5; de la banda 5 fue de 2,8 y de la banda 6 fue de 1,4.

▪ VPH Tipo 45

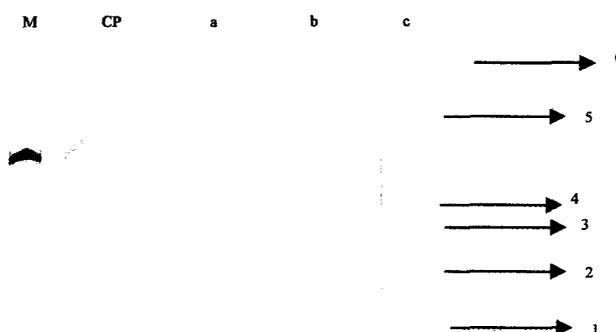


Figura 36: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 45. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "c": pacientes con VPH tipo 45. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 36 En todos los pozos se observa la presencia de cinco bandas, el FME de la banda 1 fue de 3,5; de la banda 2 fue de 2,7; de la banda 3 fue de 2,2; de la banda 4 fue de 1,9 y de la banda 5 fue de 0,9.

▪ VPH Tipo 52

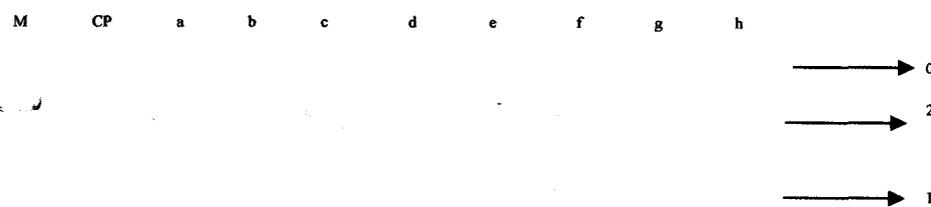


Figura 37: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 52. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "h": pacientes con VPH tipo 52. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 37, en todos los pozos se observa la presencia de dos bandas, el FME de la banda 1 fue de 1,7 y de la banda 2 fue de 0,8.

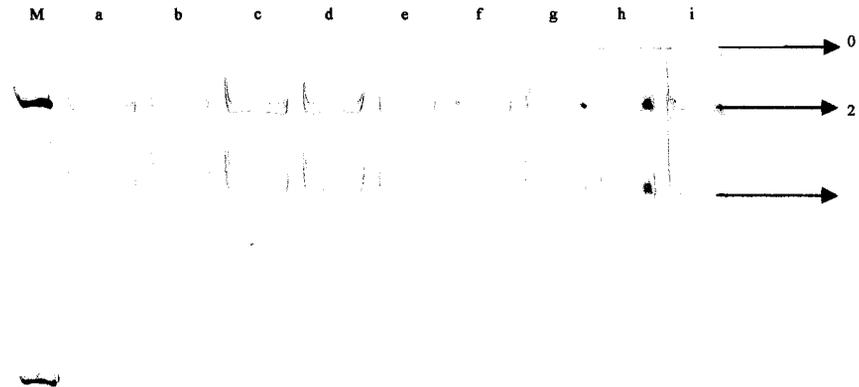


Figura 38: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 52. M: Marcador de peso molecular, Pozos “a” a “i”: pacientes con VPH tipo 52. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 38, en todos los pozos se observa la presencia de dos bandas, el FME de la banda 1 fue de 1,8 y de la banda 2 fue de 0,8.

▪ VPH Tipo 53

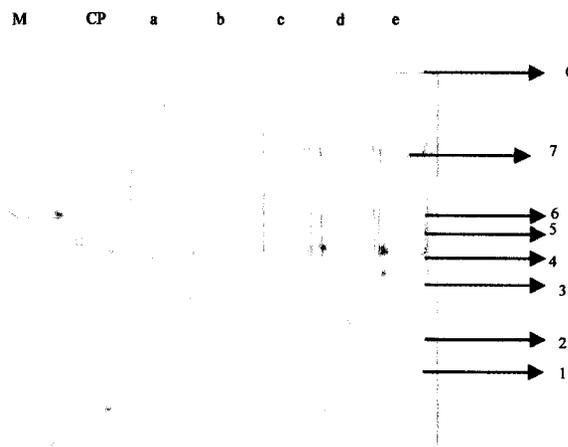


Figura 39: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 53. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos “a” a “e”: pacientes con VPH tipo 53. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 39 en todos los pozos se observa la presencia de siete bandas, el FME de la banda 1 fue de 3,8; de la banda 2 fue de 3,4; de la banda 3 fue de 2,6; de la banda 4 fue de 2,3; de la banda 5 fue de 2,2; de la banda 6 fue de 1,9 y de la banda 7 fue de 1,1.

▪ VPH Tipo 54

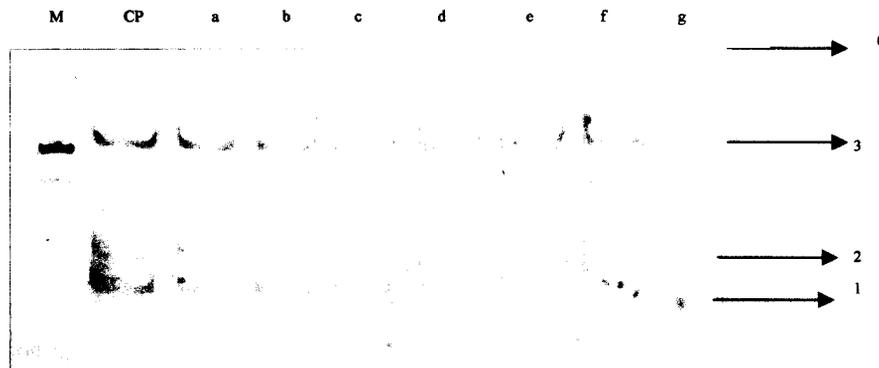


Figura 40: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 54. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "g": pacientes con VPH tipo 54. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 40, en todos los pozos se observa la presencia de tres bandas, el FME de la banda 1 fue de 3,3; de la banda 2 fue de 2,8 y de la banda 3 fue de 1,4.

▪ VPH Tipo 56

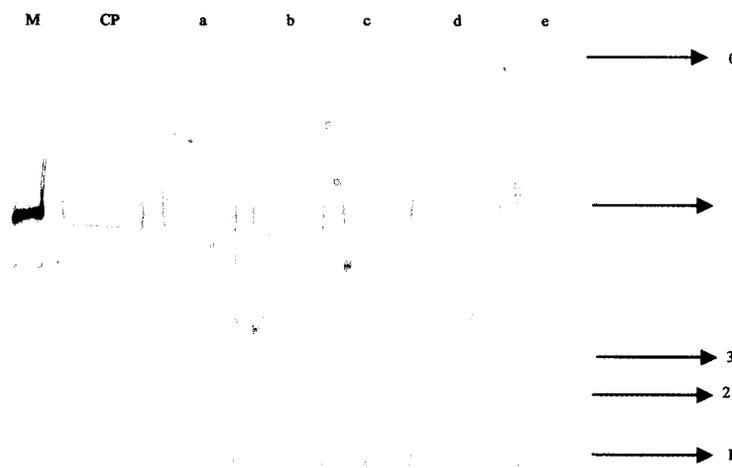


Figura 41: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 56. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "e": pacientes con VPH tipo 56. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 41, en todos los pozos se observa la presencia de cuatro bandas, el FME de la banda 1 fue de 5,3; de la banda 2 fue de 4,6 y de la banda 3 fue de 2,8.

▪ VPH Tipo 58

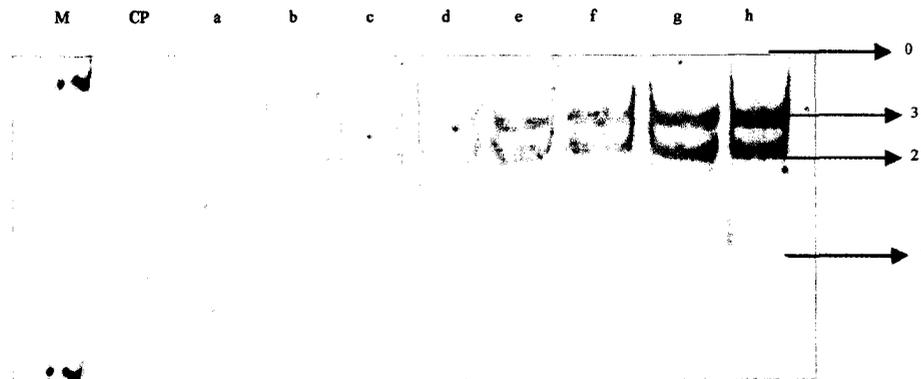


Figura 42: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 58. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "h": pacientes con VPH tipo 58. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 42, en todos los pozos se observa la presencia de tres bandas, el FME de la banda 1 fue de 3,0; de la banda 2 fue de 1,2 y de la banda 3 fue de 0,7.

▪ VPH Tipo 59

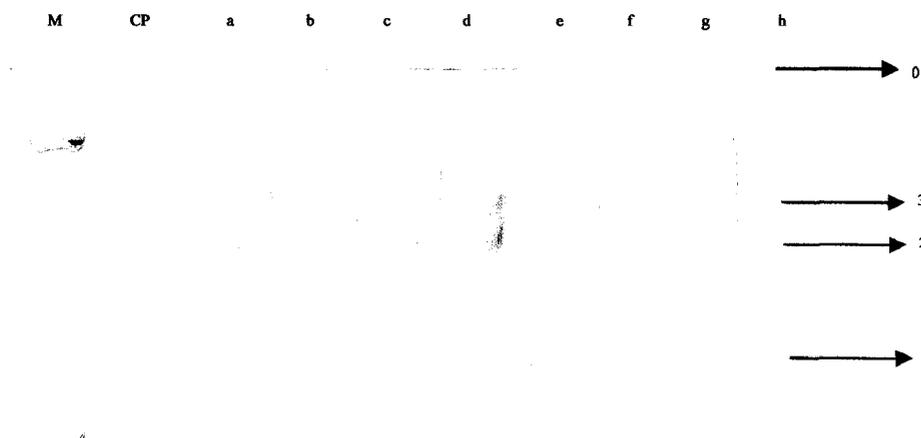


Figura 43: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 59. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "h": pacientes con VPH tipo 59. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 43, en todos los pozos se observa la presencia de tres bandas, el FME de la banda 1 fue de 3,8; de la banda 2 fue de 2,2 y de la banda 3 fue de 1,7.

■ VPH Tipo 66

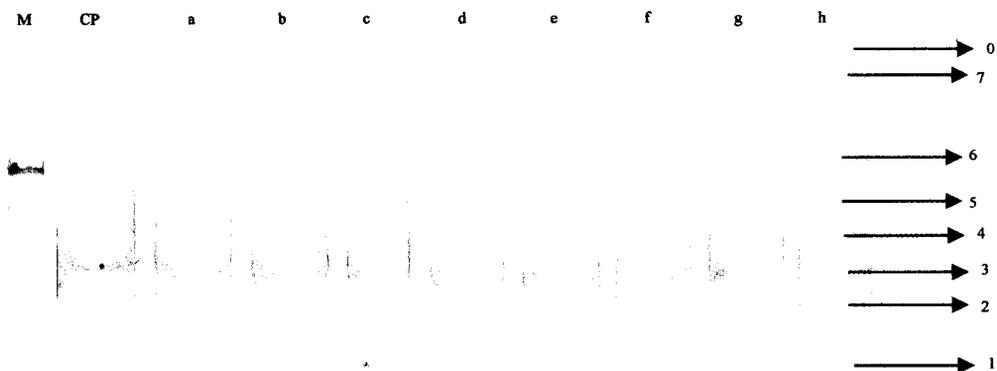


Figura 44: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 66. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "h": pacientes con VPH tipo 66. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 44, en todos los pozos se observa la presencia de siete bandas, el FME de la banda 1 fue de 4,5; de la banda 2 fue de 3,5; de la banda 3 fue de 3,2; de la banda 4 fue 2,7; de la banda 5 fue 2,3; de la banda 6 fue de 1,7 y de la banda 7 fue de 0,6.

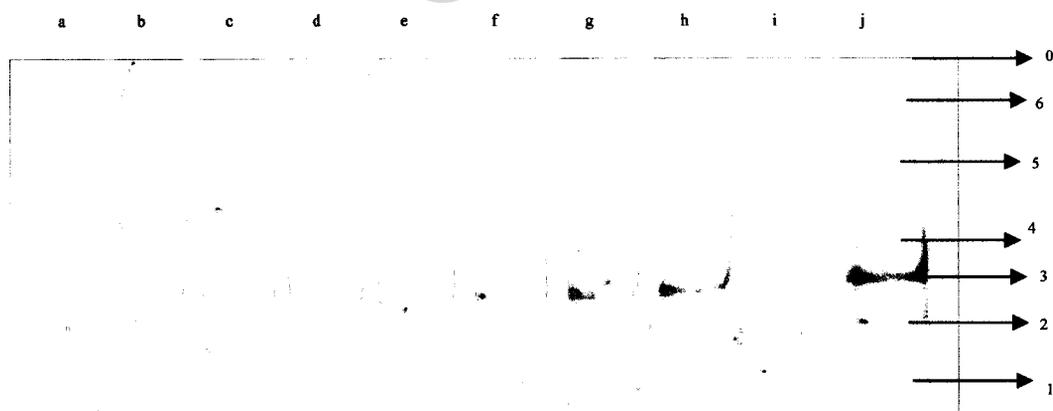


Figura 45: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 66. Pozos "a" a "j": pacientes con VPH tipo 66. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 45 en todos los pozos se observa la presencia de seis bandas, el FME de la banda 1 fue de 4,3; de la banda 2 fue de 3,5; de la banda 3 fue de 3,0; de la banda 4 fue 2,5; de la banda 5 fue 1,6 y de la banda 6 fue de 0,5.

▪ VPH Tipo 70

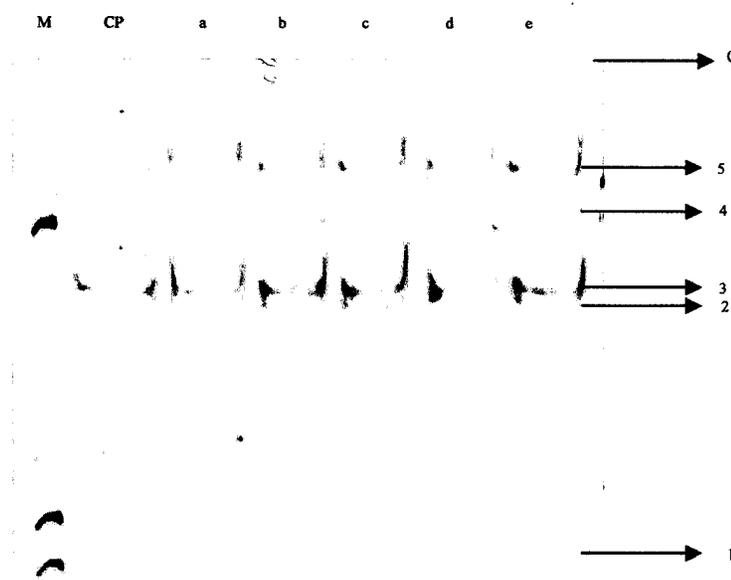


Figura 46: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 70. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "e": pacientes con VPH tipo 70. Gel de poliacrilamida al 12%.

En todos los pozos de la figura 46 se observa la presencia de cinco bandas, el FME de la banda 1 fue de 6,6; de la banda 2 fue de 3,2; de la banda 3 fue de 3,0; de la banda 4 fue 1,9 y de la banda 5 fue 1,4.

▪ VPH Tipo 81

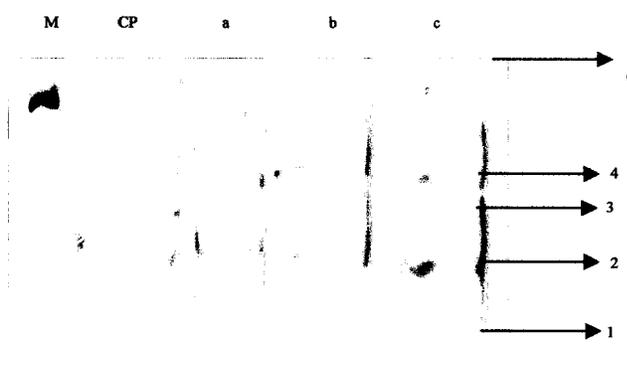


Figura 47: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH 81. M: Marcador de peso molecular, CP: control positivo, Pozos "a" a "c": pacientes con VPH tipo 81. Gel de poliacrilamida al 12%.

En la figura 47, en todos los pozos se observa la presencia de cuatro bandas, el FME de la banda 1 fue de 4,0; de la banda 2 fue de 3,2; de la banda 3 fue de 2,5 y de la banda 4 fue de 1,9.

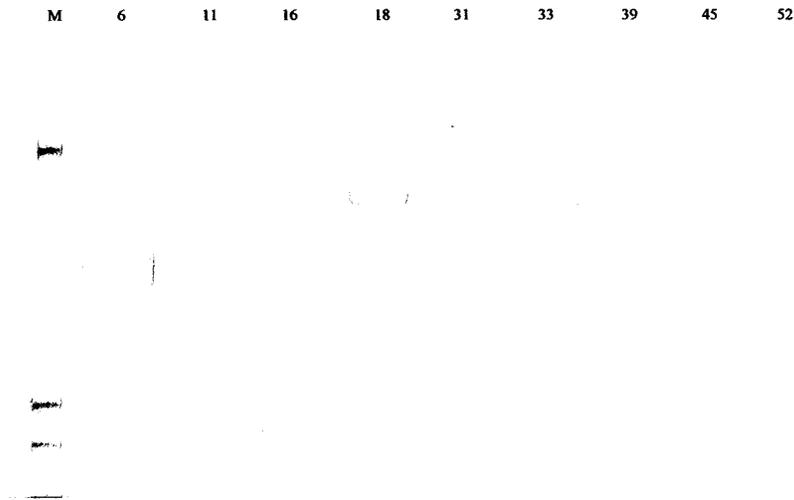


Figura 48: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH tipos: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 45 y 52. M: Marcador de peso molecular. Gel de poliacrilamida al 12%.

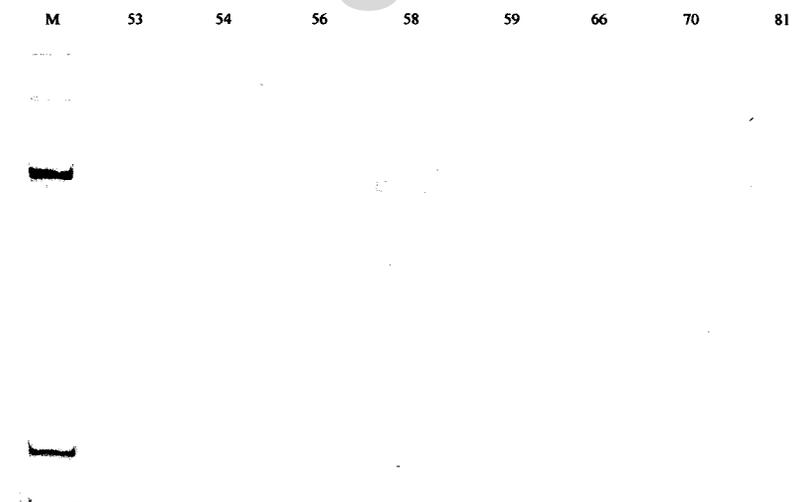


Figura 49: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para VPH tipos: 53, 54, 56, 58, 59, 66, 70 y 81. M: Marcador de peso molecular. Gel de poliacrilamida al 12%.

Las figuras 48 y 49 corresponden a geles con todos los controles positivos utilizados en esta investigación, en los mismos se confirmaron los patrones migratorios de los 17 tipos de VPH observados previamente en los geles individuales.

▪ **Evaluación de las Variables:**

Tanto en VPH 16 como 18 se obtuvieron patrones migratorios diferentes a los del control, por tanto, dichas muestras se clasificaron de acuerdo al patrón de la siguiente manera: Ver Tabla 11:

Tabla 11: Clasificación de las muestras de acuerdo al patrón de SSCP.

Tipo de VPH	Variable N°	Muestra
16	1	4110
		4274
	2	3213
18	3	06827
		4258
	4	09556
		2945
	5	
	6	4125

A las variables se les realizó reacción anidada a partir del amplificado de la primera reacción utilizando los oligonucleótidos GP5+/MY09, la cual generó un amplificado aproximado de 410 pb y posteriormente se procedió a realizar PCR-RFLP con las enzimas *Dde I*, *Hae III* y *Rsa I* para confirmar la identidad de las mismas. Para el caso de la variable 1 de VPH 16 se consideró la muestra 4110 y la variable 2 de VPH 18 solo se hizo el análisis con la muestra 4258; ver figura 50 y 51:

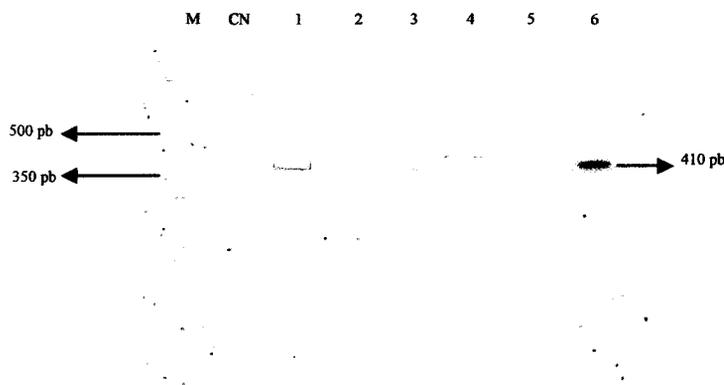


Figura 50: Amplificado de GP5+/MY09 para las variables. M: Marcador de peso molecular, CN: control negativo, pozo 1: muestra 3213, pozo 2: muestra 4110, pozo 3: muestra 4125, pozo 4: muestra 06827, pozo 5: muestra 4258 y pozo 6: muestra 2945. Gel de poliacrilamida al 6%.

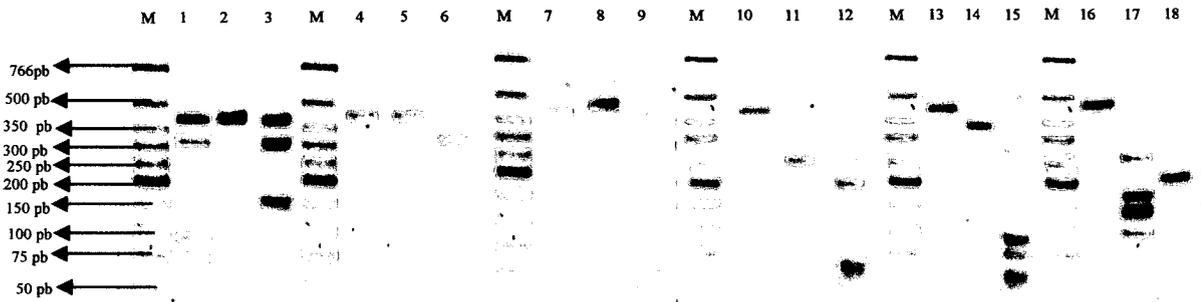


Figura 51: RFLP de las variables amplificadas. M: Marcador de peso molecular; Pozos 1, 2 y 3: muestra 3213 digerida con *Dde I*, *Hae III* y *Rsa I* respectivamente; pozos 4, 5 y 6: muestra 4110 digerida con *Dde I*, *Hae III*, y *Rsa I*; pozos 7, 8 y 9: muestra 4125 digerida con *Dde I*, *Hae III* y *Rsa I* respectivamente; pozos 10, 11 y 12: muestra 06827 digerida con *Dde I*, *Hae III* y *Rsa I* respectivamente; pozos 13,14 y 15: muestra 4258 digerida con *Dde I*, *Hae III* y *Rsa I* respectivamente; pozos 16, 17 y 18: muestra 2945 digerida con *Dde I*, *Hae III*, y *Rsa I* respectivamente. Gel de poliacrilamida al 6%.

De acuerdo al patrón de restricción establecido por Quintero y col. (2008), al digerir VPH 16 con las enzimas *Dde I* y *Hae III*, se debe conservar el tamaño del amplificado original debido a las mismas que no la digieren y la enzima *Rsa I* produce tres bandas, de 310 pb, 70 pb y 30 pb; cuando se analiza la muestra 3213 (pozos 1, 2, 3) se observan alteración en los patrones mencionados y se evidencia la presencia de un patrón mixto. Al analizar la muestra 4110 (pozos 4, 5, 6) se observa que el patrón coincide con el establecido así como la presencia de un solo tipo viral (VPH 16), asimismo, las muestra 4125 (pozos 7, 8, 9) y 4258 (pozos 13,14, 15) conservan el patrón característico para VPH 18. Por su parte, la muestra 06827 (pozos 10, 11, 12) presenta un patrón de bandas propio de VPH tipo 76, mientras que la muestra 2945 (pozos 16, 17, 18) presenta un patrón propio de VPH 11; es posible que tanto la muestra 06827 y 2945 se hayan clasificado de manera errada durante la selección de las muestras.

Solo se procedió a secuenciar las muestras en las que solo hay un tipo de VPH y que las mismas clasificaran como VPH tipo 16 o tipo 18, por ello sólo se prepararon para secuenciar las muestras 4110, 4125 y 4258.

- **Secuenciamiento:**

Para el secuenciamiento se amplificó la región GP5+/GP6+ de las tres muestras a evaluar; ver figura 52:

M CN 1 2 3

Figura 52: Amplificados de la región GP5+/GP6+ de las muestras 4110, 4125 y 4258. M: Marcador de peso molecular, CN: control negativo, pozo 1: muestra 4110; pozo 2: muestra 4125 y pozo 3: muestra 4258.

Posteriormente se cuantificó el ADN amplificado de cada una de las tres muestras previamente mencionadas mediante espectrofotometría a 260 nm; la concentración de las la muestra 4110 fue 409,5 ng/μl; de la muestra 4125 fue 362,5 ng/μl y de la muestra 4258 fue: 898,0 ng/μl.

Una vez cuantificadas las muestras se procedió a secuenciarlas utilizando los oligonucleótidos GP5+/GP6+ y posteriormente se analizaron los electroferogramas a través del programa DNA Sequencing Analysis v5.3 de Applied Biosystems y se obtuvieron las secuencias, las mismas se muestran en la tabla 12:

Tabla 12: Secuencias de las muestras

Muestra	Secuencia
4110	cTTTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAACTAACTTTAAGGAGTACCT AcGACATGGGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTCAAC
4125	AAcAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAG TATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC
4258	CATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCaATATGATGCTaccAaTTTAaGCAGTAT AGCAGACATGTTGAAGAATATgatttaCAGTTTATTTTTTCAgttAT

Los nucleótidos en minúscula indican que la base fue editada una vez que se analizó el electroferograma.

▪ **Secuencia 4110:**

Se le realizó el análisis bioinformático a la secuencia editada para conocer la identidad de la muestra; en primer lugar se aplicó el BLAST ® utilizando la base de datos de National Center for Biotechnology Information (NCBI), el mismo indicó que el amplificado correspondía de VPH 16 con una identidad máxima de 100%.

Este resultado corresponde con lo esperado, sin embargo, cuando se comparó el patrón migratorio de esta muestra con respecto al patrón positivo (ver figura 26), se observó que diferían, por tanto, se hizo la comparación de la secuencia con respecto a la del control positivo que de acuerdo con lo concluido por Fernandez (2009) con la secuencia EU118173 de la base de datos de NCBI, la cual fue secuenciada por primera vez por Kimbauer y col. (1993), por ello se procedió a realizar un alineamiento de la secuencia 4110 con esta última para evaluar los nucleótidos distintos, para ello se realizó CLUSTALW2 a través de European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), ver figura 53.

```

gi|157027542|gb|EU118173.1|      GCAGTACAAAATAIGTCAATTAATGCTGCGCCATAICTACTTCAGAAACTIACA 6700
4110VPH16                       -----CTTTAATGCTGCGCCATAICTACTTCAGAAACTIACA 35
*****

```

Figura 53: Alineamiento mediante CLUSTALW2 de la muestra 4110 con la secuencia EU118173

Al evaluar el resultado del alineamiento se observa una sustitución de tipo transversión (A por T) en la posición 6667 del genoma identificado como EU118173, en la figura 53 se observa parte del electroferograma donde ocurre la sustitución.

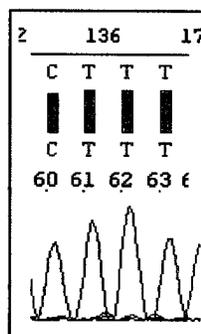


Figura 54: Sustitución de base en la muestra 4110.

▪ **Secuencia 4125:**

La secuencia se editó y posteriormente se le realizó el análisis bioinformático para conocer la identidad de la misma; para ello se aplicó el BLAST ® utilizando la base de datos de NCBI, el mismo indicó que el amplificado correspondía de VPH 18 con una identidad máxima de 100%

El resultado del BLAST indica que la muestra 4125 es VPH tipo 18 tal cual se esperaba, sin embargo, su patrón migratorio fue diferente al del control positivo (ver figura 31), el cual según el secuenciamiento de Fernández (2009), el mismo se correspondía en un 100% con la secuencia identificada con el número de acceso DQ486472 de NCBI, la fue secuenciada por Cerqueira y col (2006); posteriormente se procedió a realizar el alineamiento de la secuencia de interés (4125) con la secuencia DQ486472 para determinar la variación de nucleótidos mediante el uso de CLUSTALW2, el alineamiento se muestra en la figura 65.

```
>gi|944903339|gb|DQ486472.1|
4125
AGACATGTTGAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGTTTGTACTAT 200
AGACATGTTGAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTC----- 107
*****
```

Figura 55: Alineamiento mediante CLUSTALW2 de la muestra 4125 con la secuencia DQ486472.

En la figura 55 se observa una transición de purina, sin embargo, debido a que la secuencia DQ486472 es parcial, se procedió a comparar la secuencia 4125 con un genoma completo de la base de datos que tuviese alta homología con la secuencia de interés según el resultado de BLAST y se seleccionó la secuencia GQ180792 caracterizada por Lurchachaiwong y col. (2010), posteriormente se hizo el alineamiento mediante el uso de CLUSTALW2, ver figura 66:

```
gi|285804407|gb|GQ180792.1|
4125
GTATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTCAGTTGT 6750
GTATAGCAGACATGTTGAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTC----- 167
*****
```

Figura 56: Alineamiento mediante CLUSTALW2 de la muestra 4125.

En la figura 56 se observa que la transición de purina ocurre en la posición 6731 del genoma de VPH 18; en la figura 57 se observa parte del electroferograma donde se aprecia la base de interés.

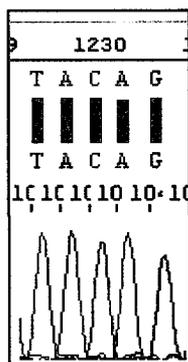


Figura 57: Sustitución de base en la muestra 4125.

■ Secuencia 4258:

Una vez obtenida la secuencia, se editó y se identificó mediante análisis bioinformático utilizando la base de datos de NCBI, a través de la cual se realizó BLAST ® y se obtuvo que la secuencia correspondió con VPH 18 con máxima identidad de 99%.

En vista de que ninguna secuencia de la base de datos fue totalmente homóloga con la secuencia de interés, se realizó un alineamiento de la secuencia 4258 con la del control positivo GQ180792 caracterizada por Lurchachaiwong y col. (2010), mediante CLUSTALW2 con el fin de evaluar los nucleótidos que presentan variación. Ver figura 58:

```

gi|235904407|gb|GQ180792.1|      GIATAGCAGACAIGTIGAGGAATAIGATTIGCAGTTTATTTTTCAGTTGT 6750
4258                             GIATAGCAGACAIGTIGAGGAATAIGATTIACAGTTTATTTTTCAGTTAT 109
*****|*****|*****|*

```

Figura 58: Alineamiento mediante CLUSTALW2 de la muestra 4258.

En la figura 58 se observan las variaciones de los nucleótidos de la secuencia 4258 con respecto a la secuencia del control positivo, las cuales ocurren en las posiciones 6719, 6730 y 6749; en los tres casos, las variaciones corresponden a sustituciones de tipo transición (A-G); en la figura 59 se muestran partes del electroferograma donde se ubican las bases de interés.

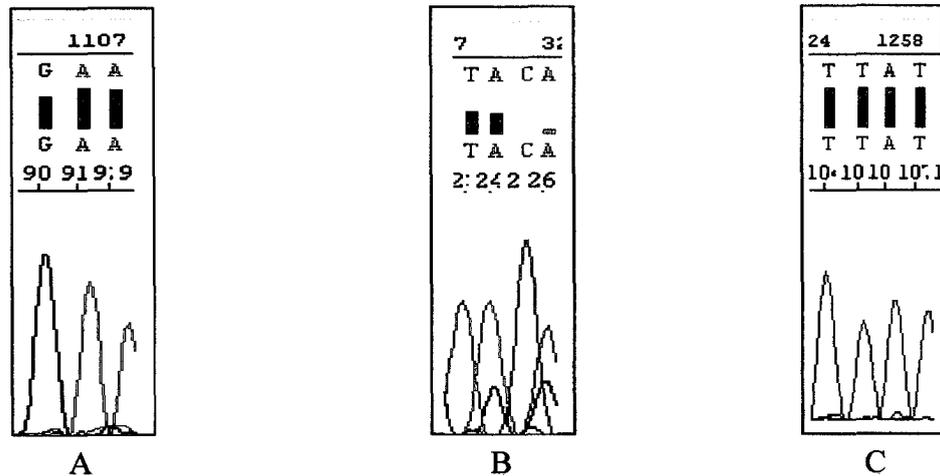


Fig. 59: Sustitución de bases en la muestra 4258 con respecto a la secuencia GQ18079. A: Sustitución en la posición 6719; B: Sustitución de la base 6730; C: Sustitución de la base 6749.

Con la finalidad de visualizar de manera agrupada las variaciones nucleotídicas se hizo un alineamiento múltiple de la secuencia 4125, 4258 y la secuencia de consenso GQ180792, para ello se realizó CLUSTALW2 de las mismas; ver figura 60:

```

gi|295904407|gb|GQ180792.1|      GTATAGCAGACAIGTIGAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTTTCAGTTGT 6750
4125                             GTATAGCAGACAIGTIGAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTTTC---- 107
4258                             GTATAGCAGACAIGTIGAGGAATATGATTTCAGTTTATTTTTTCAGTTAT 109
*****                          *****

```

Fig. 60: Alineamiento mediante CLUSTALW2 de la muestra 4125 y 4258 con la secuencia GQ180792.

De acuerdo a la figura 60, se observa que la sustitución en la base 6719 solo está presente en la muestra 4258, mientras que la sustitución en la posición 6730 es común tanto para la muestra 4258 como para la 4125, por su parte, la sustitución en posición 6749 solo se presenta en la secuencia 4258 pero no se descarta que se pueda conseguir en la muestra

4125, lo cual puede no puede confirmarse debido a que de esta última solo se secuenciaron con seguridad 109 nucleótidos.

▪ **Evaluación de Pacientes:**

Con el fin de utilizar el sistema de PCR-SSCP GP5+/GP6+ para el diagnóstico clínico de rutina se tomaron 12 Muestras de un lote de pacientes y a los mismos se les realizó PCR anidada GP5+/GP6+ a partir del amplificado MY09/MY11, como control positivo se amplificó VPH tipo 6 de origen plasmídico; ver figura 61:

CN M CP 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

www.bdigital.ula.ve

Figura 61: Amplificados de la región GP5+/GP6+ para 12 pacientes aleatorios. CN: control Negativo, M: Marcador de peso molecular, CP: Control Positivo, pozo 1: muestra SN01312, pozo 2: muestra 5536, pozo 3: muestra 5537, pozo 4: muestra 5538, pozo 5: muestra 5539, pozo 6: muestra 5540, pozo 7: muestra 5543, pozo 8: muestra 5544, pozo 9: muestra 5545, pozo 10: muestra 5546, pozo 11: muestra 5547, pozo 12: muestra 5548.

Al mismo lote de pacientes se les aplicó PCR-SSCP a partir de los amplificados previamente mencionados tanto a los que presentaron banda como a los que no la presentaron; ver figura 62:

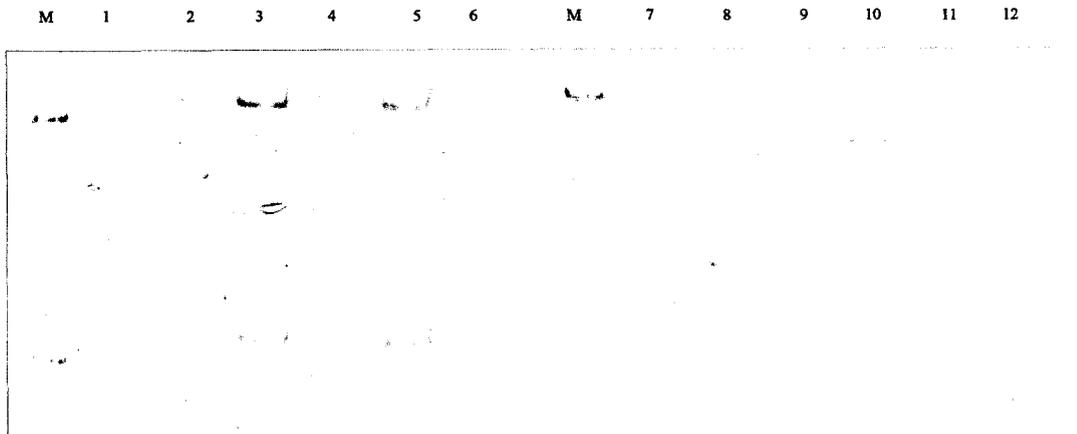


Figura 62: Gel SSCP de la región GP5+/GP6+ para 12 pacientes aleatorios. M: Marcador de peso molecular, pozo 1: paciente SN01312, pozo 2: paciente 5536, pozo 3: paciente 5537, pozo 4: paciente 5538, pozo 5: paciente 5539, pozo 6: paciente 5540, pozo 7: paciente 5543, pozo 8: paciente 5544, pozo 9: paciente 5545, pozo 10: paciente 5546, pozo 11: paciente 5547, pozo 12: paciente 5548.

Al comparar los resultados de la figura 61 con la figura 62 se puede observar que hay correlación de los pacientes en los resultados negativos (pozos 1, 2, 4, 9), aunque en los pozos 2 y 4 se puede observar la presencia de bandas tenues que resultaron de contaminación en el momento de cargar las muestras en el gel. Asimismo, los pozos 8, 10 y 11 presentan patrones definidos, los cuales se corresponden con VPH tipo 6, 59 y 31 respectivamente de acuerdo a los patrones migratorios mostrados previamente, dichos resultados concuerdan con los reportados en el diagnóstico clínico realizado mediante enzimas de restricción (resultado no mostrado); en los pozos 3, 5, 7 y 12 se observan patrones que no corresponden con los patrones obtenidos previamente y al comparar con los resultados con enzimas de restricción (resultado no mostrado) mediante estos últimos se concluyó que los mismos corresponden a patrones indefinidos debido a la coinfección por varios tipos virales.

DISCUSIÓN

El virus de papiloma humano es una de las infecciones de transmisión sexual más prevalente a nivel mundial, y la infección persistente de los tipos oncogénicos principalmente 16 y 18 es reconocido como el principal factor de riesgo en el desarrollo del carcinoma cervical y otros cánceres anogenitales (Golijow y col., 2005) (Wang y col., 2011) (Kleio y col., 2012).

Por otra parte, se han desarrollado numerosos métodos moleculares para detectar la presencia de VPH y se ha determinado que la amplificación del genoma es la técnica más sensible la cual puede detectar entre 5 y 100 copias de moléculas de ADN en un espécimen. Los ensayos de PCR utilizan oligonucleótidos consenso que amplifican regiones relativamente conservadas del genoma (Shikova y col., 2009), una de ellas es una región del gen *L1* de 450 bp la cual se amplifica mediante el uso de los oligonucleótidos MY09/MY11 (Coutlee y col. 2002) (Evander y col., 1992); otra región comúnmente utilizada también se ubica en el marco de lectura de *L1* que utiliza los oligonucleótidos GP5+/GP6+, los cuales amplifican una secuencia conservada dentro de la región L1 del genoma viral de cada tipo (Schmitt y col., 2008), dichos oligonucleótidos amplifican un fragmento que tiene una longitud entre 140 y 150 bp (Evander y col., 1992).

En este estudio se estandarizó el sistema PCR-SSCP mediante el uso los oligonucleótidos GP5+/GP6+ como reacción anidada del amplificado de MY09/MY11 debido a que estudios publicados por Aedo y col., (2007) han concluido que el uso de una PCR anidada, usando los oligonucleótidos GP5+/GP6+ a partir del amplificado MY09/MY11 puede aumentar considerablemente su sensibilidad de 10 a 100 veces, en comparación con una PCR simple que emplea únicamente MY09/MY11.

Inicialmente, en el desarrollo de esta investigación, se cuantificó el ADN de los pacientes que fueron elegidos de manera aleatoria, arrojando una concentración promedio de 355,008 ng/μl y una relación de pureza promedio de 1,373; a pesar de que este último valor fue inferior al reportado por Manchester (1996), se continuó de igual forma con el procesamiento de las muestras.

A todas las muestras se les amplificó la región MY09/MY11 y se realizó la reacción anidada con los oligonucleótidos GP5+/GP6+ para posteriormente aplicar el sistema PCR-SSCP, el cual tiene como fundamento que la cadena sencilla de ADN tiene una estructura plegada que está determinada por interacciones intramoleculares que a su vez dependen de su secuencia, por ello, una secuencia mutada es detectada mediante un cambio en la movilidad en una electroforesis en gel de poliacrilamida debido a que se altera el plegamiento de la estructura. De igual manera, la técnica de PCR-SSCP presenta una elevada precisión (entre 60 y 90%), sin embargo, la misma depende de múltiples factores físicos como temperatura, concentración de iones y solventes, los cuales deben ser optimizados para el estudio de cada región diferente (Hayashi 1991) (Eng 2005); asimismo se ha demostrado que la técnica de PCR-SSCP es altamente reproducible (Gautheron y col. 2009).

La técnica de PCR-SSCP tiene múltiples aplicaciones diagnósticas ya que la misma permite detectar mutaciones puntuales (Xu y col., 2010) y por ello se ha aplicado en análisis bacteriológicos y virales, por ejemplo, Fujita y col. (1994) utilizaron la técnica con VIH-1 para identificar cambios asociados con la adaptación viral en ciertas líneas celulares, otro ejemplo fueron Sheen y col. (2009) e Ip y col. (2006) quienes evaluaron resistencia bacteriana a fármacos en *Mycobacterium tuberculosis* y *Streptococcus pneumoniae* respectivamente; la técnica incluso se ha utilizado para genotipificar microsátelites (Liberata y col., 1998) o para identificar mutaciones de ciertos genes en la enfermedad de Alzheimer (Gautheron y col. 2009). En el caso de VPH, la PCR-SSCP se ha tomado como una alternativa para el estudio de regiones hipervariables ya que el secuenciamiento se considera como el método Gold Standart (Mayrand y col. 2000).

De acuerdo a esto se han realizado múltiples investigaciones de VPH mediante el uso de PCR-SSCP, uno de ellos fue Hernández (2010) quien evaluó la variabilidad de la región E6 de los tipos virales 6, 11, 16 y 18; asimismo, Emeny y col. (1999), evaluaron la variabilidad de la región LCR y E6 mediante PCR-SSCP de VPH 16, otro ejemplo es la investigación publicada Mayrand y col. (2000), en la cual evaluaron la variabilidad en la región I1 de VPH 16 mediante el uso de los oligonucleótidos MY09/MY11, de igual manera, Márquez

(2009) analizó la variabilidad de la región *L1* de los tipos virales 6,11,16,18,31 y 58 a través del uso de los mismos oligonucleótidos; es decir que la técnica de PCR-SSCP ha sido ampliamente utilizada y todos los autores expresan que una vez optimizada la misma es altamente reproducible y confiable para la detección de variables, lo cual concuerda con los resultados obtenidos en esta trabajo.

En el presente estudio se amplificó la región GP5+/GP6+ de la región *L1* de 17 tipos virales los cuales son los tipos más comunes en el estado Mérida (Fernandez 2009), se tomó en cuenta que otros investigadores han aplicado la misma técnica para la misma región genómica, sin embargo, han utilizado menos número de tipos virales así como de muestras, entre estos estudios se encuentra el publicado por Lizano y col. (1997) donde evaluaron variables de la región *L1* de los tipos virales 16 y 18, asimismo, Picconni y col. (2000) hicieron una investigación semejante con los tipos virales 6, 11, 16, 18 y 31 mientras que Golijow y col. (2005) aplicaron la técnica para tipificar el virus en muestras de orina en pacientes masculinos a partir del amplificado anidado GP5+/GP6+, logrando identificar los tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 34 y 51.

Los resultados de esta investigación indicaron que la región GP5+/GP6+ es altamente conservada en cada tipo viral, pero los patrones migratorios intratipo son diferentes, lo que concuerda con lo reportado por (Schmitt y col., 2008), y (Snijders y col., 1990), quienes refieren que la región GP5+/GP6+ es una secuencia altamente conservada en cada tipo viral pero divergente entre los diferentes tipos virales.

Sin embargo, para lo tipos 16 y 18 se observaron diferencias en los patrones migratorios de algunas muestras y una vez que se descartó la presencia de otros tipos virales o infección mixta se distinguió un patrón diferente para VPH 16 y dos para VPH 18, por ello, estas muestras se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos GP5+/GP6+ de acuerdo con Hang y col (2007) en donde concluyen que la amplificación anidada de una región conservada del gen *L1* de VPH con los oligonucleótidos MY09/MY11 y GP5+/GP6+ y su posterior secuenciamiento es aceptado en investigaciones científicas, no obstante, es un proceso

laborioso para aplicarlo como un protocolo de rutina en los laboratorios de diagnóstico clínico.

Con respecto al secuenciamiento, en las tres muestras se confirmó la identidad de acuerdo al patrón del análisis por RFLP, en dos de las muestras se observó la presencia de sustituciones de tipo transición mientras que en la otra se observó una transversión, sin embargo, cuando se hizo el análisis de la secuencia de aminoácidos se concluyó que en los tres casos la sustitución es silente y no afecta la identidad de los aminoácidos de la secuencia del control positivo.

Por su parte, la sustitución en la posición 6667 en la muestra 4110, fue reportada por Shang y col. (2009); el aminoácido afectado es serina y según dichos autores la consideran una de las tres mutaciones más comunes que ocurren en la región *L1*, conjuntamente con la mutación en la posición 6826 y la posición 7060, sin embargo, éstas últimas no podrían ser detectadas mediante la amplificación con los oligonucleótidos GP5+/GP6+ debido a que los mismos amplifican desde la posición 6624 hasta la 6746 del genoma de VPH 16 (Snijders y col., 1990).

Con respecto a las muestras de VPH 18, se observaron sustituciones en las posiciones 6719, 6731 y 6749, las cuales afectan a los aminoácidos ácido glutámico y leucina (últimas dos posiciones), de las cuales, la primera y la última fueron reportadas como mutaciones sinónimas por Kleio y col (2012). Como parte del clon HM596526 en NCBI®, cabe destacar que la sustitución 6731 no ha sido reportada previamente por algún autor.

Todas las sustituciones demostradas en esta investigación son silentes y por tanto no afectan la estructura de la proteína, aunque Márquez (2009) recomienda que las mutaciones silentes aun cuando no afecten a los aminoácidos implicados, deben tomarse en cuenta como marcadores que permitan un seguimiento de la cadena epidemiológica del virus en la población.

Como parte final de la optimización de la técnica PCR-SSCP se seleccionaron unas muestras aleatorias de un lote de pacientes y se evaluó el resultado en el patrón migratorio y

se concluyó que el mismo correspondía con los patrones individuales para cada tipo viral excepto en aquellas muestras donde existió coinfección donde no se detectó un patrón definido.

www.bdigital.ula.ve

CONCLUSIONES

- La técnica PCR- SSCP para la región GP5+/GP6+ fue optimizada en LABIOMEX y permitió evaluar los patrones migratorios de los 17 tipos virales en estudio.
- Los patrones migratorios de cada tipo viral fue semejante aunque difirieron entre los diversos tipos virales, lo que indicó que la región GP5+/GP6+ es altamente conservada en cada tipo viral pero varía entre ellos.
- A través de la técnica PCR-SSCP se logró identificar la presencia de variables intratipo, aún cuando la variación proviniera de una sola sustitución.
- Las variables identificadas a través de PCR-SSCP se secuenciaron y se determinó que las tres fueron producto de sustituciones silentes.

www.bdigital.ula.ve

RECOMENDACIONES

- Debe establecerse un protocolo estandarizado para que la técnica de PCR-SSCP pueda ser reproducible en diferentes laboratorios a nivel mundial y así evaluar los patrones migratorios de cada tipo viral y sus variables.
- La técnica de PCR-SSCP puede indicar la presencia de una infección mixta, sin embargo se sugiere realizar estudios posteriores para conocer los patrones migratorios característicos de la misma.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdul N, Brown C, Gaston K. The regulation of cell proliferation by the papillomavirus early proteins. *Cell. Mol. Life Sci.* 2009; 66: 1700 – 17.
- Aedo S., Melo A., García P., Guzmán P., Capurro I., Roa J. Detección y tipificación de virus papiloma humano en lesiones preneoplásicas del cuello uterino mediante PCR-RFLP
- Detection and typification of human papilloma virus in pre cancerous cervical lesions. 2007. *Rev Méd Chile*; 135: 167-73
- Ministerio del Poder Popular para la Salud. Anuario de Mortalidad 2008. Caracas.
- Barzon L, Giorgi C., Buonaguro F., Palù. Guidelines of the Italian Society for Virology on HPV testing and vaccination for cervical cancer prevention. 2008. *Infectious Agents and Cancer* ; 3 (14).
- Beidler J., Hilliard P., Rill R. Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. 1982. *Anal. Biochem*; 126:374–380. En: Wang Q., Li J., Wang S., Bai F. Rapid differentiation of Phenotypically Similar Yeast Species by Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis of Ribosomal DNA. 2008. *Applied and Environmental Microbiology*; 74 (9): 2604–11.
- Bernard H, Chan S, Manos M, Ong C, Villa L, Delius H. y col., Identification and assessment of known and novel human papillomavirus by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis.* 1994; 170: 1077- 85. En: Quintero M., Cruz J., Bastidas M., Márquez L., Puig J. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR- RFLP. 2008. *Rev Obstet Ginecol Venez*; 68(1):25-31
- Bishop B., Dasgupta J., Klein M., Garcea R., Christensen N., Zhao., Chen X. Crystal Structures of Four Types of Human Papillomavirus L1 Capsid Proteins. Understanding the specificity of neutralizing monoclonal antibodies. 2007. *The Journal of Biological Chemistry*; 282 (43): 31803–11

- Bishop B., Dasgupta J., Xeng X. Structure-based engineering of papillomavirus major capsid L1: controlling particle assembly. 2007. *Virology Journal* 4(3).
- Blin N., Stafford D. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. 1976. *Nucleic Acids Research*; 3 (9): 2303-8.
- Boner, W., Taylor, E., Tsirimonaki, E., Yamane, K., Campo, M., Morgan I., (2002) A functional interaction between the human papillomavirus 16 transcription/replication factor E2 and the DNA damage response protein TopBP1. 2002. *J. Biol. Chem*; 277: 22297–303.
- Buck C., Cheng N., Thompson C., Lowy D., Alasdair S., Schiller J., Trus B. Arrangement of L2 within the Papillomavirus Capsid. 2008. *Journal of Virology*; 82 (11): 5190–7.
- Burd E., Human Papillomavirus and Cervical Cancer. 2003. *Clinical Microbiology Reviews*; 16 (1): 1–17 Vol. 16, No. 1
- Burk R., Chen Z. Harari B., Smith B., Kocjan P., Maver P., Poljak M. Classification and nomenclature system for Human Alphapapillomavirus variants: general features, nucleotide landmarks and assignment of HPV6 and HPV11 isolates to variant lineages. 2011. *Acta Dermatoven APA* ; 20 (3): 113-23
- Cañadas M., Lloveras B., Lorincz A., Ejarque M., Font R., Bosch X., de Sanjosé S. Evaluación de las técnicas de detección del VPH en los programas de cribado para cáncer de cuello uterino. 2006. *salud pública de México*; 48 (5):373-78.
- World Health Organization (WHO) Cervical cancer, human papillomavirus (HPV), and HPV vaccines - Key points for policy-makers and health professionals. Geneva. 2007.
- Cervicovaginal cytology based on the Papanicolaou Technique; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. 3a ed. GP15- A3; 28(28).
- Chen Z., Schiffman M., Herrero R., DeSalle R., Anastos K., Segondy M., Sahasrabudhe V., Gravitt P., Hsing A., Burk R. Evolution and Taxonomic Classification of Human Papillomavirus 16 (HPV16)-Related Variant Genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. 2011. *PLoS ONE*; 6 (5): 1-16

- **Combelas N., Sausseureau E., Fleury M., Ribeiro T., Gaitan J. Duarte D., Coursaget P., Touzé A., Papillomavirus pseudovirions packaged with the L2 gene induce cross- neutralizing antibodies. 2010. Journal of Translational Medicine; 8 (28). <http://www.translational-medicine.com/content/8/1/28>.**
- **Conway M, Meyers C. Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. 2009. J Dent Res; 88(4): 307-17.**
- **Coutlée F., Gravitt P., Kornegay J., Hankins C., Richardson H., Lapointe N., Voyer H., Franco E. Use of PGMV Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. 2002. Journal of Clinical Microbiology; 40(3): 902:7.**
- **Curiel J., Lozada R. Berumen J., Briones J., Catarino A. Detección citológica de virus del papiloma humano y su correlación con PCR: Estudio prospectivo en 55 casos. 1999. Revista Mexicana de Patología Clínica; 46 (2): 74-8.**
- **Day P., Baker C., Lowy D., Schiller J. Establishment of papillomavirus infection is enhanced by promyelocytic leukemia protein (PML) expression. 2004. PNAS; 101 (39): 14252-7.**
- **De Roda A., Walboomers J., van den Brule A., C., Snijders P. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. 1995. Journal of General Virology; 76:1057-1062.**
- **De Villiers E., Fauquet C., Broker T., Hans-Ulrich B., zur Hausen H. Classification of papillomaviruses.2004. Virology; 324: 17- 27**
- **Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. 2006. Clinical Science; 110: 525-41.**
- **Doorbar J., Gallimore P., Identification of Proteins Encoded by the L1 and L2 Open Reading Frames of Human Papillomavirus 1a. 1987. Journal of Virology; 61(9): 2793-9**
- **Drobni P. Papillomavirus Binding and Entry. The heparan sulfate receptor and inhibition by lactoferrin. Department of Clinical Microbiology, Virology 2005.Umeå University, Sweden.**

- Emeny R., Herron J., Fu L., Koutsky L., Kiviat N., Wheeler C. Comparison of Variant-Specific Hybridization and Single-Strand Conformational Polymorphism Methods for Detection of Mixed Human Papillomavirus Type 16 Variant Infections. 1999. *Journal of Clinical Microbiology*; 37 (11): 3627–33.
- Eng C., Limitations of Single-Strand Conformation Polymorphism Analysis As a High-Throughput Method for the Detection of *EGFR* Mutations in the Clinical Setting. Letter to the Editor. 2005. *Journal of Clinical Oncology*: 5847-48.
- Evander M., Edlund K., Boden E., Gustafsson A., Jonsson M., Karlsson R., Rylander E., Wadell G. Comparison of a One-Step and a Two-Step Polymerase Chain Reaction with Degenerate General Primers in a Population-Based Study of Human Papillomavirus Infection in Young Swedish Women. 1992. *Journal of Clinical Microbiology*; 30 (4): 98-92.
- Fernández L. Clonamiento y secuenciamiento parcial del gen *L1* de los papilomavirus más frecuentes en la población de Mérida-Venezuela [Tesis de Maestría]. Mérida: Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias; 2009
- Forslund O, Göran Hansson B. Human Papillomavirus Type 70 Genome Cloned from Overlapping PCR Products: Complete Nucleotide Sequence and Genomic Organization. 1996. *Journal of clinical microbiology*; 34(4): 802–9.
- Fujita K., Silver J. Single-strand conformational polymorphism. 1994. *Genome Res.* 4: S137-40.
- Gautheron V., Auffret A., Mattson M., Mariani J., Vernet-der Garabedian B., A new and simple approach for genotyping Alzheimer's disease presenilin-1 mutant knockin mice. 2009. *J Neurosci Methods*; 181(2): 235-40
- Glasel JA: Validity of nucleic acid purities monitored by 260 nm/280 nm absorbance ratios. 1995. *Biotechniques*; 18:62-3. En: Muyal J., Muyal V., Kaistha B., Seifart C., Fehrenbach H. Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: checkpoint towards gene expression studies 2009. *Diagnostic Pathology*; 4 (9). <http://www.diagnosticpathology.org/content/4/1/9>

- Ghittoni R, Accardi R, Hasan U, Gheit T, Sylla B, Tommasino M. The biological properties of E6 and E7 oncoproteins from human papillomaviruses. 2010. *Virus Genes*; 40:1–13.
- Golijow C., Pérez L., Smith H., Abba Martín. Human papillomavirus DNA detection and typing in male urine samples from a high-risk population from Argentina. Short communication. 2005. *Journal of Virological Methods*; 124 (2005): 217–20
- Graham J., Colposcopia. 1959. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*: 28-34
- Han M., Robinson M. PCR-SSCP Analysis of Polymorphism. A Simple and Sensitive Method for Detecting Differences Between Short Segments of DNA. En: Bartlett J., Stirling D. *Methods in Molecular Biology*. Second Edition. Totowa: Humana Press Inc; 2003: Vol. 226 p. 327-37.
- Hang S., Vigliotti V., Vigliotti J., Pappu S. Routine human papillomavirus genotyping by DNA sequencing in community hospital laboratories. 2007. *Infectious Agents and Cancer*; 2 (11) <http://www.infectagentscancer.com/content/2/1/11>
- Hayashi K. PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA. 1991 *Genome Res*; 1: 34-8.
- Hernández D., Diseño y Estandarización de un Sistema PCR-SSCP del Gen E6 para Detección y Tipificación del Virus del Papiloma Humano (VPH). [Tesis de Grado]. Mérida: Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias; 2010.
- Herrington C. Human Papillomavirus and cervical Neoplasias. I. Classification, Virology, Pathology, and Epidemiology. 1994. *J. Clin Pathol*; 47: 1066-1072.
- Horvath C., Boulet G., Renoux V., Delvenne P., Bogers J., Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. 2010. *Virology Journal*; 7 (11). <http://www.virologyj.com/content/7/1/11>
- International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp> Accesado: 20 febrero 2012.

- Ip M., Chau S., Chi F., Qi A., Lai R. Rapid Screening of Fluoroquinolone Resistance Determinants in *Streptococcus pneumoniae* by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism and Single-Strand Conformational Polymorphism. 2006. *Journal of Clinical Microbiology*; 44(3): 970–5
- Joyce J., Tung J., Przysiecki C., Cook J., Lehman D., Sands J., Jansen K., Keller P. The L1 Major Capsid Protein of Human Papillomavirus Type 11 Recombinant Virus-like Particles Interacts with Heparin and Cell-surface Glycosaminoglycans on Human Keratinocytes. 1999. *The Journal Of Biological Chemistry*; 274 (9): 5810–22.
- Kadaja M., Silla T., Ustav E., Ustav M. Papillomavirus DNA replication-From initiation to genomic instability. 2009. *Virology*; 384: 360–368.
- Kleio C., Kottaridi C., Chranioti A., Spathis A., Kassanos D., Paraskevaidis E., Karakitsos P. Genetic Variability and Phylogeny of High Risk HPV Type 16, 18, 31, 33 and 45 *L1* Gene in Greek Women. 2012. *International Journal of Molecular Sciences*; 13: 1-17
- Klingelutz, A., Foster S., McDougall. J. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. 1996. *Nature* 380, 79 –82.
- Letian T., Tianyu Z., Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. 2010. *Virology Journal*; 7(2). <http://www.virologyj.com/content/7/1/2>
- Leyva A., Aranda C.,González C. Lazcano E. La baja utilidad de la determinación del ADN del VPH en la región distal de la uretra masculina.2003. *Salud pública de México*; 45 (Supl. 5): S589-93.
- Liberata D., Palmirotta R., Veri M., Mammarella S., D'Amico F., Curia M., Aceto G., Crognale S., Creati B., Mariani-Costantini R., Battista P., Cama A. Optimized PCR labeling in mutational and microsatellite analysis. 1998. *Clinical Chemistry*; 44:7:1381–7.
- Lizano M., Berumen J., Guido M., Casas L., García-Carranca A., Association Between Human Papillomavirus Type 18 Variants and Histopathology of Cervical Cancer. 1997. *Journal of the National Cancer Institute Brief Communications*; 89 (16)1227-31.

- Longworth M, Laimins L. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. 2004. *Microbiology and molecular biology reviews*; 68(2) 362–372.
- Lowe J., Panda D., Rose S., Jensen T., Hughes W., Yue F., Angeletti P. Evolutionary and structural analyses of alpha-papillomavirus cápside proteins yields novel insights into L2 structure and interaction with L1. 2008. *Virology Journal*. 5:150. <http://www.virologyj.com/content/5/1/150>.
- Manchester K. Use of UV methods for measurement of protein and nucleic acid concentrations. 1996 *Biotechniques*; 20:968-970. En: Muyal J., Muyal V., Kaistha B., Seifart C., Fehrenbach H. Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: checkpoint towards gene expression studies 2009. *Diagnostic Pathology*; 4 (9). <http://www.diagnosticpathology.org/content/4/1/9>
- Márquez L. Identificación de Variantes de Papilomavirus Humano de los Tipos 6, 11, 16, 18, 31 y 58 en una Población del Estado Mérida, Venezuela. [Tesis de Maestría]. Mérida: Universidad de Los Andes, Facultad de Ciencias; 2009
- Mayrand M., Coutlé F., Hankins C., Lapointe N., Forest P., Ladurantaye M., Roger M. Detection of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Consecutive Genital Samples Does Not Always Represent Persistent Infection as Determined by Molecular Variant Analysis. 2000. *Journal of Clinical Microbiology*; 38(9): 3388–93.
- Mc. Bride A. Replication and Partitioning of Papillomavirus Genomes. 2008. *Adv Virus Res*; 72: 155–205.
- Modis Y., Trus B., Harrison S., Atomic model of the papillomavirus capsid. 2002. *The EMBO Journal*; 21(18): 4754-762.
- Muñoz N, Castellsagué X, Berrington A, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006. 24S3. S3/1–10.
- NC_001526.2; Human papillomavirus type 16, complete genome. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_001526.2.
- New England Biolabs Inc. 2005.06 Catalog & Technical Reference. USA. 2004.

- Oletta J, Carvajal A, Peña S. Cáncer, un problema de salud en Venezuela con datos epidemiológicos retrasados. Red de Sociedades Científicas Médicas Venezolanas. 2011. Alerta Epidemiológica; 194. Número Especial.
- Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis single-strand conformation polymorphisms. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 86: 2766-70.
- Pan American Health Organization. Burden of Human Papillomavirus (HPV) Infection and HPV Related Disease in Latin America and the Caribbean, and Health and Economic Outcomes of HPV Vaccination in Selected Countries in Latin America. 2008.
- Picconni M., Alonio L., García A., Lizano M., Cervantes G., Distefano A., Mural J., Bazan G., Teyssie A. Variantes Moleculares De Virus Papiloma Humano (Hpv) Tipos 16 y 18 En Adenocarcinomas De Cervix. 2000. Medicina (Buenos Aires); 60: 889-894.
- Pretorius R, Bao Y., Belinson J., Burchette R., Smith J, Qiao Y. Inappropriate gold standard bias in cervical cancer screening studies. 2007; Int. J. Cancer; 121: 2218-24.
- Pyeon D., Pearce S., Lank S., Ahlquist P., Lambert P. Establishment of Human Papillomavirus Infection Requires Cell Cycle Progression 2009. PLoS Pathogens; 5 (2).
- Qu W., Jiang G., Cruz Y., Chang C., Ho G., Klein R., Burk R. Pcr Detection of Human Papillomavirus: Comparison Between My09/My11 And Gp5+/Gp6+ Primer Systems. 1997. Journal of Clinical Microbiology; 35 (6): 1303-10.
- Quintero M., Cruz J., Bastidas M., Márquez L., Puig J. Detección y tipificación de virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR- RFLP. 2008. Rev Obstet Ginecol Venez; 68(1):25-31
- Rada A., Taboada G. Métodos de Obtención y Purificación de ADN humano para su aplicación en Genética Molecular. 1998. Biofarbo; 6: 63-8.
- Sambrook J., Russel D. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3ra Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001: Vol. 1 p. 1.31-34

- Sapp M., Bienkowska M., Viral entry mechanisms: human papillomavirus and a long journey from extracellular matrix to the nucleus. 2009. FEBS J.; 276(24): 7206–7216.
- Schädlich L., Senger T., Gerlach B., Mücke N., Klein C., Bravo I., Müller M., Gissmann L. Analysis of Modified Human Papillomavirus Type 16 L1 capsomeres: the Ability To Assemble into Larger Particles Correlates with Higher Immunogenicity. 2009. Journal of Virology; 83 (15): 7690–705.
- Scheffner, M., Werness, B., Huibregtse, J, Levine, A. Howley, P. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. 1990. Cell; 63, 1129–36.
- Shang Q., Wang Y., Fang Y., Wei L., Chen S., Sun Y., Li B., Zhang F., Gu H. Human Papillomavirus Type 16 Variant Analysis of E6, E7, and L1 Genes and Long Control Region in Identification of Cervical Carcinomas in Patients in Northeast China. 2011. Journal of Clinical Microbiology; 49 (7): 2656–63
- Sheen P. Méndez M, Gilman R., Peña L., Caviedes L., Zimic M. Zhang Y., Moore D., Evans C. Sputum PCR–Single-Strand Conformational Polymorphism Test for Same-Day Detection of Pyrazinamide Resistance in Tuberculosis Patients. 2009. Journal of Clinical Microbiology; 47(9): 2937–43.
- Schiffman M., Philip C. Human Papillomavirus Epidemiology and Public Health. Arch Pathol Lab Med. 2003; 127: 930-34
- Schmitt M., Dondog B., Waterboer T., Pawlita M. Homogeneous Amplification of Genital Human Alpha Papillomaviruses by PCR Using Novel Broad-Spectrum GP5+ and GP6+ Primers. 2008. Journal of Clinical Microbiology. 46 (3): 1050–9
- Shikova E., Todorova I., Ganchev G., Kouseva V. Detection And Typing Of Human Papillomaviruses By Pcr. 2009. Biotechnol. & Biotechnol. Special Edition: 877-80.
- Sieczkarski S., Whittaker G. Dissecting virus entry via endocytosis. 2002. Journal of General Virology; 83: 1535–45.
- Snijders P., Van den Brule A., Schrijnemakers H., Snow G., Meijer C., Walboomers J. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection

- of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. 1990. *Journal of General Virology* ; 71: 173-81.
- Sotlar K., Diemer D., Dethleffs A., Hack Y., Stubner A., Vollmer N., Menton S., Menton M., Dietz K., Wallwiener D., Kandolf R., Bültmann B. Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. 2004. *Journal of Clinical Microbiology*; 42 (7): 3176-84.
 - Tomita Y., Shirasawa H., Simizu B. Expression of Human Papillomavirus Types 6b and 16 LI Open Reading Frames in *Escherichia coli*: Detection of a 56,000-Dalton Polypeptide Containing Genus-Specific (Common) Antigens. 1987. *Journal of Virology*; 61(8): 2389-94.
 - Vernon S., Unger E., Williams D., Comparison Of Human Papillomavirus Detection And Typing By Cycle Sequencing, Line Blotting, And Hybrid Capture. 2000. *Journal of Clinical Microbiology*; 38(2):651-55.
 - Wang X., Meyers C., Wang H., Chow L, Zhi Z. Construction of a Full Transcription Map of Human papillomavirus Type 18 during Productive Viral Infection. 2011. *Journal of Virology*; 85(16): 8080–92.
 - World Health Organization Human Papillomavirus Laboratory Manual. 1st. Edition. Geneva, 2009.
 - World Health Organization (WHO). Human Papillomavirus Vaccine Background paper 2008. Geneva.
 - Xu H., Jiang R., Sha W., Li L., Xiao H. PCR–Single-Strand Conformational Polymorphism Method for Rapid Detection of Rifampin-Resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Systematic Review and Meta-Analysis. 2010. *American Society for Microbiology*; 48 (10): 3635–40.
 - Zheng Z., Backer c. Papillomavirus genome structure, expression, and Post-transcriptional regulation. 2006. *Front Biosci.* ; 11: 2286–302.
 - Zhu X., Niu N., Liu Y., Du T, Chen D, Wang X. Harvest G, Liu Y. Improvement of the sensitivity and resolution of PCR-SSCP analysis with optimized primer concentrations in PCR products. 2006. *Journal of Genetics*; 85 (3): 233-5

- zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009; 384: 260–65.

www.bdigital.ula.ve

www.bdigital.ula.ve