

00377

20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

DISEÑO DE UN BIOCHIP DE DNA (TIPO
GENESENSOR) PARA LA DETECCIÓN DE LAS
VARIANTES ASIÁTICO AMÉRICANA Y EUROPEA
DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO TIPO 16

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACÁDEMICO DE :
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA:
BIOL. PATRICIA MENDOZA LORENZO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

MÉXICO, D.F.



OCTUBRE, 2003

COORDINACIÓN

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Autorizo a la Dirección General de Administración Escolar de UNAM a darme en formato electrónico el contenido de mi trabajo de grado.
NOMBRE: Patricia Mendoza Lorenzo
FECHA: 22 - Octubre - 2003
FIRMA: Patricia Mendoza Lorenzo

* Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 1 de septiembre de 2003, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Mendoza Lorenzo Patricia, con número de cuenta 96575985, con la tesis titulada: "Diseño de un biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de las variantes Asiático Americana y Europea del virus de papiloma humano tipo 16.", bajo la dirección del(a) Dr. Mauricio Salcedo Vargas.

- Presidente: Dra. Annie Pardo Semo
- Vocal: Dr. Rogelio Maldonado Rodríguez
- Secretario: Dr. Mauricio Salcedo Vargas
- Suplente: Dr. Luis Felipe Jiménez García
- Suplente: Dra. Marcela Lizano Soberón

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de octubre de 2003.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

APOYOS

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – Fondos Sectoriales 7114 y también por el Fondo para el Fomento a la Investigación – IMSS 2002/132.

Durante el desarrollo de este trabajo fui becaria de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, del Instituto Mexicano del Seguro Social y de la Dirección General de Estudios de Posgrado.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en general a todos los miembros del Laboratorio de Tecnología del DNA de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional todo el apoyo y todas las facilidades otorgadas para la realización de la presente investigación.

Agradezco al M. en C. Alfonso Méndez Tenorio todas las facilidades y asesorías otorgadas para el uso y manejo de los softwares de análisis de secuencias empleados durante el desarrollo del proyecto.

De manera muy especial agradezco a la Q. F. B. Ruth Abigail Pacheco Rivera por toda la asesoría y el apoyo brindado para la adecuada realización de las hibridaciones realizadas dentro del proyecto de Maestría.

Expreso mi más profundo agradecimiento a la M. en C. Patricia Piña Sánchez por facilitarme la obtención de las muestras analizadas y por la asistencia técnica brindada durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco la asistencia técnica brindada por el aspirante a grado de Dr. Ricardo López Romero para la realización de este trabajo.

Agradezco al aspirante a grado de M. en C. Hueman Jaimes Díaz por las asesorías sobre el uso de diversas herramientas bioinformáticas.

A mi hija

Fernanda Patricia

¡ Mi amor chiquito lindo, te amo !

4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

	Página
RESUMEN	1
1.0 INTRODUCCION	2
1.1 El virus de papiloma humano (VPH) y el cáncer en México.	2
1.1.1 Clasificación del VPH.	5
1.2 El VPH tipo 16 y su participación en el cáncer cervical invasor.	7
1.2.1 Clasificación del VPH tipo 16.	7
1.2.2 Sistemas para detección de HPV.	9
1.3 Los biochips de DNA y su impacto en el diagnóstico clínico.	10
1.3.1 El sistema genesensor; hibridación en tandem.	11
2.0 JUSTIFICACION	13
3.0 HIPOTESIS	14
4.0 OBJETIVO GENERAL	14
4.1 Objetivos particulares.	14
5.0 MATERIALES Y METODOS	15
5.1 Tejidos y muestras.	15
5.2 Amplificación de un fragmento del gen E6 para la detección de la variante AA y AAc del HPV 16.	15
5.3 Amplificación de un fragmento del gen E6 para la detección de la variante E del HPV 16.	16
5.4 Características del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de las variantes AA y E desde el gen E6 del HPV 16.	17
5.4.1 Oligonucleótidos sintéticos utilizados.	17
5.4.1.1 Características de las sondas de detección de las variantes AA y E del HPV 16.	18
5.4.1.2 Preparación de la matriz de soporte (portaobjetos) para el biochip de DNA (tipo genesensor).	19
5.4.1.3 Fijación de las sondas en el biochip de DNA (tipo genesensor).	20
5.4.1.4 Características de los DNA blancos sintéticos de tipo silvestre y mutante que distinguen a las variantes AA y E desde el gen E6 del HPV 16.	22
5.4.1.5 Características de los estabilizadores sintéticos prealineados al DNA blanco que distingue a las variantes AA y E en el gen E6 del HPV 16.	23
5.4.1.5.1 Marcaje de los estabilizadores con P-ATP.	24
5.4.2 Alineación del DNA blanco con los estabilizadores: formación del duplex parcial.	24
5.4.3 Reacción de hibridación.	25
5.4.4 Autoradiografía	26
5.4.5 Programas computacionales a utilizar en el diseño del Biochip de DNA (tipo genesensor).	26

6.0	RESULTADOS	28
6.1	Diseño de los biochips de DNA (tipo genesensor) para la detección de las variantes AA y E del HPV 16.	28
6.1.1	Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAa/c en el gen E6 del HPV 16.	28
6.1.1.1	Análisis del DNA blanco sintético.	28
6.1.1.2	Análisis con DNA blanco tumoral.	29
6.1.2	Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAC en el gen E6 del HPV 16.	30
6.1.2.2	Análisis con DNA blanco tumoral.	31
6.1.3	Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E en el gen E6 del HPV 16.	33
6.1.3.1	Análisis del DNA blanco sintético.	33
6.1.3.2	Análisis con DNA blanco tumoral.	34
6.2	Detección de las variantes AA y E del HPV 16 mediante el biochip de DNA (tipo genesensor).	36
6.2.1	Detección de la variante AAa/c en el gen E6 del HPV 16 con DNA blanco sintético.	36
6.2.2	Detección de la variante AAC en el gen E6 del HPV 16 con DNA blanco sintético.	37
6.2.3	Detección de la variante E en el gen E6 del HPV 16 con DNA blanco sintético.	37
6.2.4	Detección de la variante AAa/c y AAC en el gen E6 del HPV 16 con DNA blanco Tumoral.	40
6.2.5	Detección de la variante E en el gen E6 de HPV 16 con DNA blanco proveniente de la línea celular Caski.	53
7.0	DISCUSION	60
7.1	Aspectos generales.	60
7.2	Análisis del diseño de detección de las variantes AA y E.	63
7.3	Análisis de las imágenes de detección de las variantes AA y E en el Biochip de DNA (tipo genesensor).	65
7.4	El Biochip de DNA (tipo genesensor) en comparación con otros sistemas de detección de HPV.	71
8.0	CONCLUSIONES	74
9.0	SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS	75
10.0	REFERENCIAS	76

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema del genoma del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV 16).	3
Figura 2. Mutaciones puntuales en la secuencia de los genes E6 y L1 que distinguen a las variantes y subvariantes del HPV 16.	6
Figura 3. Esquema del biochip de DNA (tipo genesensor) mediante hibridación en tandem.	12
Figura 4. Distribución de las sondas en los portaobjetos.	21
Figura 5. Estrategia general para la detección de las variantes AA y E del HPV 16.	27
Figura 6. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAa/c del HPV 16 con DNA blanco sintético.	29
Figura 7. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAa/c del HPV 16 en DNA blanco tumoral.	30
Figura 8. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAC del HPV 16 con DNA blanco sintético.	31
Figura 9. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAC del HPV 16 en DNA blanco tumoral.	32
Figura 10. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E del HPV 16 con DNA blanco sintético.	33
Figura 11. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E del HPV 16 en DNA blanco tumoral: con A3.	34
Figura 12. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E del HPV 16 en DNA blanco tumoral: con A2.	35
Figura 13. Detección de las variantes AA, AAC y E del HPV 16 por hibridación del DNA blanco sintético mutante sobre los genesensores.	38
Figura 14. Detección de las variantes AA, AAC y E del HPV 16 por hibridación del DNA blanco sintético sobre los genesensores.	39
Figura 15. Detección de las variantes AAa/c y AAC del HPV 16 en DNA blanco tumoral proveniente de pacientes con cáncer cervical invasor.	44
Figura 16. Detección de las variantes AAa/c y AAC del HPV 16 en DNA blanco tumoral proveniente de pacientes con cáncer cervical invasor.	45
Figura 17. Detección de las variantes AAa/c y AAC del HPV 16 en DNA blanco tumoral sobre genesensores con sondas sin lavar.	46

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Funciones de las proteínas del virus de papiloma humano (HPV).	4
Tabla 2. Distribución global de las variantes del virus de papiloma humano tipo 16 en cáncer cervical.	8
Tabla 3. Iniciadores usados en la amplificación de tres regiones del gen E6 de HPV 16.	17
Tabla 4. Sondas sintéticas fijadas en el blochip de DNA (tipo genesensor).	19
Tabla 5. Características de los DNA blancos sintéticos de tipo silvestre (wt) y mutante (mut) que distinguen a las variantes AA y E desde el gen E6 del HPV 16.	22
Tabla 6. Características de los estabilizadores sintéticos prealineados al DNA blanco que distingue a las variantes AA y E en el gen E6 del HPV 16.	23
Tabla 7. Marcaje de los estabilizadores con P-ATP.	24
Tabla 8. Mezcla de reacción para la alineación del DNA blanco con los estabilizadores.	24
Tabla 9. Mezcla de reacción para Hibridación.	25

RESUMEN

El cáncer cervical invasor (ICC) es la segunda neoplasia más común en las mujeres de todo el mundo. En México el ICC es la primer causa de muerte en mujeres mayores de 30 años y se sabe que el virus de papiloma humano (HPV) es el principal factor etiológico de mayor riesgo. El HPV tipo 16 se registra en más del 95 % de las infecciones cervicales y estudios epidemiológicos proveen evidencia de que algunas de sus variantes pueden incrementar el riesgo de ICC. Se distinguen 5 variantes virales para HPV tipo 16 divididas geográficamente en 5 grupos filogenéticos: africana (Af), asiática (As), asiático americana(AA), europea (E) y norteamericana (NA). En México, se estudia la alta incidencia de cáncer cervical (50 casos →100 000 mujeres), siendo las variantes AA y E las más frecuentes (más del 90% de las infecciones) y donde la variante AA resulta ser la de mayor riesgo de desarrollar ICC. Aunque la problemática de las infecciones por HPV persiste como un problema de salud pública, la caracterización de las secuencias y la identificación de las variantes es aun limitada. Este trabajo propone el diseño, implementación y validación de un biochip de DNA (tipo genesensor*) para la detección molecular de las variantes AA (a/c y c) y E, mediante la detección de mutaciones puntuales presentes en sitios específicos de la secuencia del gen E6 del HPV tipo 16. El diseño e implementación del biochip de DNA (tipo genesensor)* requirió el uso de DNA sintético (DNA blanco silvestre y mutante, sondas de captura y oligonucleótidos estabilizadores), mientras que su validación se realizó con DNA proveniente de muestras de ICC y la línea celular Caski, ambas positivas para HPV. Las sondas de captura de entre 9 y 10 pb con la secuencia interrogada fueron fijadas sobre laminillas de portaobjetos convencionales representando los genesensores* que se utilizaron en las pruebas de hibridación. Tres fragmentos del gen E6 fueron amplificados (A1, A2 y A3) en muestras positivas para HPV 16. A1 representa un fragmento de 126 pb que permite distinguir a la variante AAa/c (nt 145 G→T) y AAc (nt 183 T→G) por el cambio en la posición de un solo nucleótido, mientras que A2 y A3 de 165 y 77 pb distinguen a la variante E por un cambio de base en la posición 350 (T→G) del HPV tipo 16. Tanto el DNA blanco sintético como cada uno de los amplificados obtenidos de las muestras con ICC y Caski fueron sometidas a hibridación sobre los genesensores*. Alineamientos altamente específicos fueron registrados tanto con DNA blanco sintético, como con DNA proveniente de ICC y Caski. El uso de DNA de muestras con ICC previamente secuenciadas positivas para variantes AAa/c, AAc y E del HPV 16 refuerzan nuestros resultados al obtenerse los amplificados esperados y registrarse señales de hibridación solo en aquellos sitios donde las secuencias (DNA blanco-sonda) son 100% complementarias. Señales inespecíficas fueron registradas en algunas muestras debido posiblemente a la presencia de coinfecciones virales o bien a las características propias de las secuencias interrogadas. Utilizando la tecnología de los biochips de DNA (tipo genesensor)* se logró discriminar e identificar variantes del HPV 16 lo que permite proveer nuevos métodos diagnósticos y pronósticos del ICC de forma rápida, económica, sensible y confiable.

INTRODUCCIÓN

1.1 El virus de papiloma humano y el cáncer en México

El cáncer en México ocupa en la actualidad el segundo lugar como causa de mortalidad en la población adulta y en las mujeres mayores de 30 años ocupa la primera causa de muerte (Compendio de Registro Histopatológico de Neoplasias en México, 1998).

En cuanto a los agentes que contribuyen al desarrollo del cáncer, se han mencionado dos tipos de carcinógenos, los primeros comprenden a los agentes que dañan genes involucrados en el control de la proliferación de la célula y los que participan en la migración y adhesión celulares, los segundos tienen la característica de no ocasionar un daño directo al material genético, pero promueven la proliferación de las células tumorales.

Se estima que un 75 % de los tumores malignos del ser humano se deben a factores ambientales; incluyen agentes químicos (consumo de tabaco), físicos (radiación ultravioleta) y biológicos (representados por los virus). Donde, aproximadamente un 15 % de las muertes por cáncer en el mundo son atribuidas a tumores asociados a infecciones virales (Panduro, 2000)

Los agentes virales que con mayor frecuencia se han relacionado con el desarrollo del cáncer corresponden a virus de DNA, como los virus de papiloma humano (HPV) tipos 16 y 18, que se pueden transmitir por contacto sexual y que participan en forma directa con el cáncer cervical invasor (ICC) (Panduro, 2000, Walboomers, et. al., 1999).

El cáncer cervical invasor (ICC) es la segunda neoplasia más común en las mujeres de todo el mundo y se sabe que el HPV es uno de los principales factores etiológicos de mayor riesgo (Burk, 1999; Walboomers, et. al., 1999).

Los papilomavirus tienen un diámetro de 55 nm, compuestos de 72 capsómeras, las cuales están formadas por la proteína L1 y la proteína L2. El genoma de estos virus consiste en un círculo de DNA de doble cadena (7200 – 8000 pb), que se encuentra en el interior de la Cápside, asociado a proteínas tipo histonas y con más de 10 diferentes marcos de lectura abiertos (Ver Figura 1).

Por otra parte, el genoma del HPV ha sido dividido en tres regiones básicas; la región reguladora que contiene secuencias que controlan la transcripción, otra región que contiene muchos de los genes involucrados en la replicación viral y una región estructural que codifica a diversos componentes del virus (Burk, 1999). Cada una de estas regiones codifica proteínas con funciones específicas resumidas en la Tabla 1.

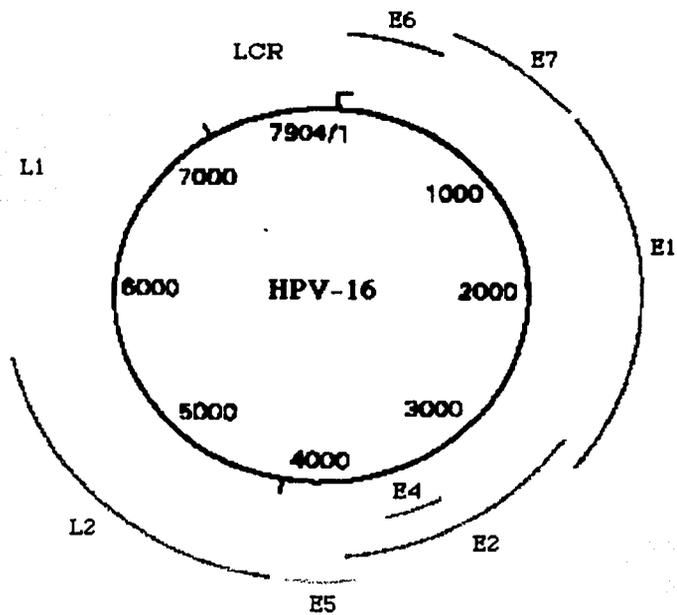


Figura 1. Esquema del genoma del virus de papiloma humano tipo 16 (HPV 16).
(Fuente: Burk, 1999; Panduro, 2000)

Tabla 1. Funciones de las proteínas del virus del papiloma humano (HPV).
(Fuente: Modificada de Favre, 1997 y Panduro, 2000)

GEN	FUNCION
E1	ATPasas-dependiente de DNA, helicasa dependiente de ATP: permite que se desenrolle el genoma viral y actúa como factor de alargamiento de la replicación del DNA. E1 se asocia con la DNA polimerasa alfa, un componente de la maquinaria de replicación celular.
E2	Es la responsable de reconocer y unirse al origen de replicación. Las proteínas E1 y E2 forman un complejo que estimula y estabiliza el enlace de E1 al origen de replicación. Se expresa en dos formas: la forma larga (transactivador transcripcional) y la truncada (represor transcripcional). En general, regula la transcripción del genoma viral.
E3	Desconocida.
E4	Expresión tardía: la parte C terminal se une a los filamentos intermedios, permite la liberación de las partículas virales. También esta involucrada en la transformación de la célula hospedera por desregulación de las vías de señalización mitogénicas.
E5	Obstrucción de los mecanismos de supresión del crecimiento: como el receptor EGF; activación de las vías de señalización mitogénicas vía factores de transcripción: c-Jun y c-Fos (importantes en la vía de degradación por ubiquitinas del complejo de p53 por E6). Inactivación de p21 (induce la expresión de p53 cuya función es corregir posibles mutaciones en el DNA durante el ciclo celular).
E6	Es capaz de interactuar con proteínas celulares involucradas en la regulación negativa de la división celular. Induce la transformación de la célula hospedera al unirse a la proteína supresora de tumores p53 provocando su rápida degradación vía proteólisis mediada por ubiquitinas.
E7	Proteína transformante, se une a pRB / p107. Además puede interactuar con otras proteínas que controlan el crecimiento celular como la proteína cinasa p33cdk2, la ciclina A, o bien, factores de transcripción como la familia AP1.
E8	Desconocida.
L1	Proteína mayor de la cápside: puede formar partículas virales
L2	Proteína menor de la cápside: empaquetamiento del DNA viral
LCR	Región larga de control: la parte 5' del LCR contiene sitios de terminación de la transcripción y de poliadenilación para los RNAm y en algunos casos puede contener secuencias que codifican para proteínas de la capsida La región central del LCR, flanqueada por dos sitios de unión de las proteínas E2, funciona como un potenciador transcripcional y contiene sitios de unión para al menos 11 diferentes factores de transcripción celular ubiquitinados (AP1, TEF1, NF1, etc.). La parte 3' del LCR contiene regiones ricas en A T que corresponden al origen de replicación.

Se sabe que el mecanismo de transformación por el HPV es vía la síntesis de sus oncoproteínas virales E6 y E7 consideradas de alto riesgo para cáncer debido a que pueden estimular el crecimiento celular y, en su conjunto, participar en la inmortalización y transformación celular vía la formación de complejos con proteínas celulares relacionadas con el ciclo celular, como p53 y pRB respectivamente quienes terminan siendo inactivadas. La proteína E6 de estos virus tiene además la propiedad de cooperar con el oncogen ras en la inmortalización de algunas líneas celulares (Panduro, 2000; Kammer, et. al., 2001).

1.1.1 Clasificación del virus de papiloma humano.

Actualmente se conocen cerca de 200 diferentes tipos de HPV, 30 de ellos asociados con neoplasias cervicales (Emeny, et. al., 1999). Yamada, et.al., en 1997 reportan que el DNA del HPV es detectado en más del 95 % del ICC en todo el mundo, siendo el HPV tipo 16 (HPV 16) el más común en tumores (Hildesheim, et. al., 2001) con una frecuencia de más del 50 % (Burk, 1999; Yamada, et.al., 1997).

Los virus de papiloma humano se clasifican de acuerdo a los cambios que presentan en su genoma. Los tipos de HPV se definen por variaciones en su secuencia en más del 10%, los subtipos varían entre un 2 - 10%, las variantes intratipo presentan cambios entre el 1-2% y finalmente las subvariantes se distinguen por cambios muy específicos (mutaciones puntuales) en regiones conservadas del genoma (Kammer, et. al., 2000). De tal manera que una secuencia de nucleótidos en una región específica del genoma se puede usar para diferenciar específicamente ciertos tipos virales, tanto por la posición como por la substitución de bases (mutaciones puntuales), lo que incluso puede ser relevante para diferenciar su potencial oncogénico (Kammer, et. al., 2000; Wheeler, et. al., 1997; Yamada, et. al., 1997) (Ver Figura 2).

E6*															L1*						NOMBRE	
1	1	1	1	1	1	1	2	2	3	3	4	5	6	6	6	6	6	6	6	6	6	n
0	3	3	4	4	7	8	8	8	3	5	0	3	9	2	0	5	6	9				
9	1	2	3	5	8	3	6	9	5	0	3	2	5	1	3	4	2	4				
↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓				
T	A	G	C	G	T	T	T	A	C	T	A	A	A	G	A	C	T	G				
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(referencia		
-	-	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(E-350T	44	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(E-A178T	3	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	(E-350G	48	
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	(E-m	2	
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	(E-C109G	3	
-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(E-G131T	4	
-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	(E-G131G	8	
-	-	-	-	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(As	11	
-	-	C	G	T	-	-	A	G	T	-	-	-	-	A	-	T	-	A	(Af1-a	39	
-	-	C	G	T	-	-	A	G	T	-	-	-	C	A	-	T	-	A	(Af1-a	1	
-	-	C	T	G	-	-	A	G	T	-	G	-	-	A	-	T	-	A	(Af1-b	1	
-	G	-	G	T	-	-	A	G	T	-	-	-	-	A	-	T	-	A	(Af1-c	1	
-	G	-	G	T	-	-	A	G	T	G	-	-	-	A	-	T	-	A	(Af1-d	2	
C	-	T	G	T	-	-	A	G	T	-	G	-	C	A	-	T	-	A	(Af2-a	17	
C	-	T	G	T	-	-	A	G	T	-	G	-	C	C	-	T	-	A	(Af2-a	1	
-	-	-	G	T	-	-	A	G	T	-	-	-	C	A	-	T	-	A	(Af2-b	7	
-	-	-	G	T	-	-	A	G	T	G	-	-	-	A	-	T	-	A	(Af2-b	1	
-	-	-	-	T	-	-	A	G	T	G	-	-	C	A	-	T	-	A	(NA1	1	
-	-	-	-	T	-	-	A	G	T	G	-	G	C	A	T	T	-	A	(AA-a	41	
-	-	-	-	T	-	-	A	G	-	G	-	G	C	-	-	T	-	A	(AA-b	1	
-	-	-	-	T	-	-	A	G	T	G	-	G	C	A	-	T	C	A	(AA-b	1	
-	-	-	-	T	-	G	A	G	T	G	-	G	C	A	-	T	C	A	(AA-c	10	

TOTAL=247

* = genes E6 y L1 del HPV 16.

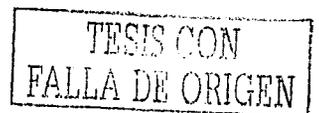
Los números en la parte superior indican la posición del nucleótido que muta con respecto al genoma viral de referencia.

n = frecuencia de la variante con respecto al número total de los casos analizados.

En rojo se resalta las mutaciones de interés para este trabajo y el nombre respectivo de la variante.

Figura 2. Mutaciones puntuales en la secuencia de los genes E6 y L1 que distinguen a las variantes y subvariantes del HPV 16

(Fuente: Modificada de Yamada, et al., 1997).



1.2 El virus de papiloma humano tipo 16 y su participación en el cáncer cervical invasor.

Estudios preliminares sugieren que variantes del HPV 16 pueden mostrar cierto grado de asociación con neoplasia cervical, lo que puede explicar parcialmente porqué algunas infecciones progresan hacia el desarrollo del cáncer más rápidamente que otras (Hildesheim, et.al., 2001). Esta asociación puede ser explicada por diferencias en la regulación transcripcional del virus, en la actividad biológica de las proteínas vírales codificadas o en la habilidad del hospedero para responder inmunológicamente a epítomos vírales específicos codificados por estas variantes (Hildesheim, et.al., 2001).

Recientes investigaciones de tipo epidemiológico proveen evidencia, de que diferentes variantes del HPV 16 presentan diferente potencial oncogénico e incluso mencionan que una infección combinada de variantes virales puede incrementar el riesgo de cáncer cervical (Hildesheim, et. al., 2001).

1.2.1 Clasificación del virus de papiloma humano tipo 16.

Dentro del HPV 16 se distinguen 5 variantes virales divididas geográficamente en 5 grupos filogenéticos: Europea (E), Africana (Af), Asiática (As), Asiático Americana (AA) y Norte Americana (NA). Yamada, et. al., 1997 en un estudios internacionales realizado en muestras colectadas de tumores con ICC muestran una perspectiva mundial de los cambios que prevalecen en la secuencia de las variantes reportadas para HPV tipo 16. En la tabla 2 se representa la distribución global del total de las variantes registradas para HPV 16 donde sobresalen las variantes intratipo E350G, E350T, AA y Af 1/2 principalmente.

La distribución geográfica de los tipos de HPV y de sus variantes específicas, puede estar influenciada por factores como coevolución del HPV con las razas humanas, los patrones de migración humana y el buen estado viral como medio de transmisibilidad (Yamada, et. al., 1997). Sin embargo, las variantes predominantes a nivel mundial son la E, AA y Af principalmente. La mayoría de los casos con ICC están asociados a la típica variante Europea (E) descrita en investigaciones previas, seguida de la variante Asiático Americana (AA) quienes resultan ser más agresivas que otras variantes en estudios epidemiológicos (Eschle, et. al., 1992; Ho, et. al., 1993; Yamada, et. al., 1997; Hildesheim, et. al., 2001) (Ver Tabla 2).

Por su parte Berumen, et. al., 2001 y Casas, et. al., 1999 investigan la alta incidencia de cáncer cervical en México (50 casos por cada 100 000 mujeres) encontrando una alta prevalencia de las variantes oncogénicas E y AA del HPV 16. En el caso de la población mexicana, a diferencia de lo registrado en otras partes del mundo, la variante AA resulta ser la de mayor riesgo de cáncer cervical en comparación con otras variantes como la E (frecuencia 21 veces mayor en pacientes con cáncer cervical), donde se le asocia tanto con carcinomas de células escamosas como de adenocarcinomas, mientras que a la variante E se le asocia solo con carcinomas de células escamosas. Con este estudio se concluye que la variante AA pudiera ser más oncogénica que la variante E, lo que puede contribuir a una más rápida progresión hacia el desarrollo de cáncer cervical en México (Ver Tabla 2).

De acuerdo con la clasificación mundial de Yamada, et.al., 1997 y Wheeler, et.al., 1997 la variante AA del HPV 16 se divide a su vez en tres subvariantes denominadas: AA tipo a, AA tipo b y AA tipo c. De acuerdo con las estadísticas reportadas a nivel mundial por estos autores, la variante AA tipo a es la más frecuente con un 14.8%, sin embargo para el caso particular de México suelen ser muy frecuentes tanto la variante AA tipo a, como la AA tipo c, ambas con una frecuencia cercana al 45% en la población infectada con HPV 16 (Salcedo., 2002 comunicación personal). De aquí la importancia de diseñar un dispositivo que permita no solo la detección de la variante viral, sino también el tipo de subvariante, pues dependiendo de el tipo específico de variante pueden ser los riesgos de desarrollar o no algún tipo de cáncer, además de optimizarse los tratamientos a seguir en pro de erradicar la enfermedad.

Tabla 2. Distribución global de las variantes del virus de papiloma humano 16 (HPV 16) en cáncer cervical (Fuente: Yamada, et. al., 1997; Berumen, et. al., 2001).

VARIANTE	NORTEAMERICA %	CENTRO Y SUR AMERICA %	MEXICO* %	EUROPA %	ASIA %	AFRICA %
E350T	53	24.6	7.8	40	53.3	7.8
E350G	40	52.2	46.1	44	5.7	1.6
AA	0	19.7	44.2	14	5.7	0
As	3.3	0	0	2	25.7	0
Af1	0	2.2	0	0	0	60.9
Af2	3.3	1.3	0	0	8.6	29.7

* NA variant 1.3%

De acuerdo con la Tabla 2 las variantes Europea (E) y Asiático Americana (AA) representan más del 90 % de las infecciones causadas por HPV 16 a nivel mundial (Yamada, et. al., 1997; * Berumen, et. al., 2001)

Además, Berumen, et. al., 2001 encuentran que las mujeres infectadas con la variante AA tienen mayor riesgo de desarrollar más rápidamente cáncer cervical (27 veces) que las mujeres que no están infectadas con la variante, mientras que las mujeres infectadas con la variante E tienden a desarrollar el cáncer en un periodo de tiempo más largo (3.3 veces).

1.2.2 Sistemas para detección de HPV.

Aunque la problemática de las infecciones por HPV persiste ya como un problema de salud pública, los sistemas de detección de HPV aun son limitados. Algunos métodos basados en PCR han sido usados ampliamente para identificar tipos específicos de virus, su distribución y su asociación con ciertas neoplasias (Greer, et. al., 1995). La tecnología de la PCR, particularmente con los iniciadores MY09/11 y GP5/6 han sido usados para elaborar la historia natural de las infecciones con HPV (Gravitt, et. al., 1998). La captura híbrida basada en la formación de híbridos de RNA-DNA, presenta una alta sensibilidad para detectar infecciones por HPV de alto riesgo (Peyton, et. al., 1998). Sin embargo, el reconocimiento de infecciones de HPV mediante estos métodos ha sido necesario pero no suficiente para llegar a entender las causas de su progresión hasta ICC.

Nuevas técnicas son actualmente sometidas a consideración para llegar al entendimiento de la biología de las infecciones por HPV. En este contexto Wheeler, et. al., en 1997 desarrolla métodos basados en hibridación simplificada de DNA para detectar no solo tipos virales, sino variantes del HPV tipo 16.

Más recientemente, se han comparado diversos métodos para resaltar la capacidad de detección viral dentro de una mezcla de variantes de HPV 16. Emeny, et. al., 1999 compararon hibridación variante-específica (VSH) basada en PCR y el método denominado polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) demostrando que ambos análisis pueden ser usados como herramientas en la detección de las variantes del HPV tipo 16 presentes en infecciones de muestras clínicas.

Aunque los resultados con los métodos anteriores sean satisfactorios, en la actualidad la utilidad de dichas pruebas en sus formas comerciales se ve limitado por ser relativamente caras para establecerse como técnicas de rutina en el ámbito de la salud pública.

1.3 Los biochips de DNA y su impacto en el diagnóstico clínico.

En la última década, los progresos en genética y biología molecular, nos han llevado al descubrimiento de novedosas técnicas para la síntesis, análisis y manipulación de los ácidos nucleicos, tal es el caso de los biochips de DNA que hoy en día son posibles de realizar de manera sencilla y a un bajo costo. Los chips de DNA denominados también sistemas genesensor, microarreglos de DNA o arreglos de oligonucleótidos de alta densidad combinan técnicas tradicionales de biología molecular que permiten el análisis simultáneo de cientos de genes (normales y mutados) y que prometen revolucionar el estudio de los procesos celulares. Algunos de los beneficios que esto trae consigo incluyen el descubrimiento de un gran número de genes asociados a diversas patologías y el desarrollo de nuevas técnicas enfocadas al diagnóstico de enfermedades genéticas provocadas por ellas, como un primer paso en el desarrollo de medidas preventivas útiles en el diagnóstico y pronóstico a precios accesibles (Lockhart and Winzeler, 2000; Wooster, 2000).

Generalmente las pruebas basadas en DNA hasta hoy involucraban una cantidad considerable de procesos tanto para muestras de tejidos como para análisis de sangre, los cuales resultaban ser muy laboriosos, costosos y que consumían bastante tiempo, sin embargo con el advenimiento de los chips de DNA será posible refinar y automatizar los métodos de secuenciación convencional reduciendo dramáticamente los costos y tiempo de procesamiento requerido en las pruebas de diagnóstico con DNA las cuales resultan de gran impacto y significado en el diagnóstico clínico y en la investigación biomédica (Wallraff, et. al., 1997)

Los chips de DNA pueden ser usados para diferentes propósitos tales como: medir los niveles de expresión de miles de genes simultáneamente y con los patrones de expresión inferir su función, detectar mutaciones puntuales o zonas altamente polimórficas, identificar amplificaciones o deleciones, detectar alteraciones en el número de copias en el DNA, identificar genes causantes de enfermedades y medir sus niveles de actividad, permitir clasificaciones más precisas de las enfermedades y hacer estudios de evolución y filogenia entre otros, lo que nos acerca cada vez más al pleno conocimiento de los mecanismos de regulación, desregulación, funciones celulares y vías bioquímicas tanto de células normales como alteradas (Epstein and Butow, 2000).

Los chips de DNA resultan ser además muy prácticos y económicos al no requerir un volumen muy grande de muestra y poder ser montados en soportes simples como placas de vidrio que miniaturizan y agilizan el procedimiento reduciendo costos y aumentando beneficios.

1.3.1 El sistema genesensor: hibridación en tandem.

Los biochips de DNA del tipo genesensor se llevan a cabo mediante hibridación en tandem, la cual contempla el uso de oligonucleótidos estabilizadores prealineados a un DNA blanco de cadena sencilla formando un duplex parcial que confiere al sistema algunas ventajas como el ser un método conveniente para introducir una marca dentro de una cadena de DNA blanco ($\gamma^{32}\text{P}$ -ATP, biotina, etc), prevenir la formación de estructuras secundarias que puedan interferir con la hibridación de las sondas fijadas a la superficie del vidrio e incrementar el enmascaramiento de secuencias redundantes en la cadena blanco dejando al descubierto solo la secuencia de interés (Maldonado-Rodríguez, et. al., 2002; Beattie, et. al., 2001) (Ver Figura 6).

Este duplex parcial se hibrida sobre sondas que reconocen la secuencia del DNA blanco que se ubica en la vecindad inmediata (en tandem), lo que le confiere una estabilidad mayor que la que ocurre en la hibridación tradicional (Maldonado-Rodríguez, et. al., 2002; Beattie, et. al., 2001). Este aumento en la estabilidad se debe al apilamiento de las bases ubicadas en los extremos contiguos de la sonda y del oligonucleótido estabilizador. Estas bases tienen mas libertad de movimiento y de apilamiento que las del DNA rigidizado por la columna vertebral de azúcar fosfato. Las variaciones de la secuencia del DNA blanco, tales como las debidas a mutaciones puntuales, que se ubiquen en la región reconocida por la sonda, cercanas al sitio de contigüidad afectaran tanto la unión de la sonda al DNA blanco como al estabilizador con respecto a la sonda que tenga una secuencia perfectamente complementaria a la del DNA blanco, permitiendo así la discriminación adecuada de ambas secuencias.

Adicionalmente, el reconocimiento de las secuencias del DNA blanco por la sonda y por el estabilizador le proporcionan alta especificidad a la hibridación. En consecuencia, esta tecnología hace posible la buena discriminación de mutaciones puntuales sin sacrificio de la especificidad, lo cual no ocurre con la hibridación tradicional. Esta tecnología ha sido descubierta, descrita en detalle y patentada por Maldonado-Rodríguez, et. al., 1999b, Beattie, et. al., 2001 y Maldonado-Rodríguez, et. al., 2002.

Recientemente nuestro grupo ha demostrado que con el uso de la hibridación en tandem es posible realizar el diagnóstico molecular del cáncer medular de tiroides vía la detección de mutaciones puntuales específicas (Barrera-León, et. al., 2003). De esta forma su aplicación se esta extendiendo a otros modelos como el HPV 18, oncogén ras, etc. (comunicación personal, en proceso).

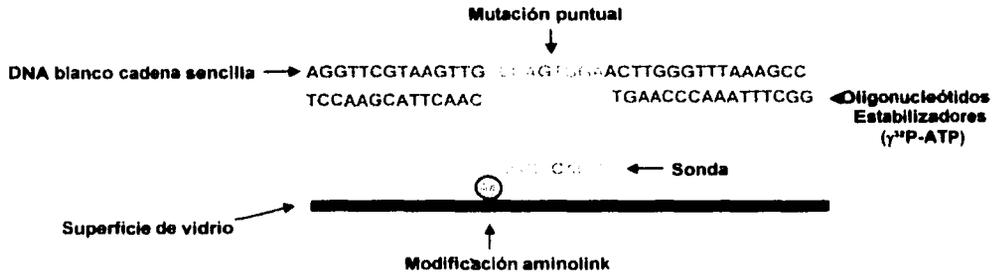


Figura 3. Esquema del Biochip de DNA (tipo genesensor) mediante hibridación en tandem.

En el presente trabajo enfocaremos nuestra tecnología en el diseño de un chip de DNA, dirigido a la identificación de variantes virales (incluso subvariantes) tanto por la posición como por la sustitución de bases (mutaciones puntuales) del gen E6, el cual permite identificar las variantes Europea (E) y Asiático Americana (AA) del HPV 16 en muestras de lesiones del cuello uterino.

JUSTIFICACIÓN

El virus del papiloma humano (HPV) es el principal factor etiológico asociado al cáncer cervico uterino (en más del 95 %) con más de 200 tipos vírales de los cuales aproximadamente 30 de ellos están asociados con neoplasias cervicales, siendo el HPV-16 el tipo más común detectado representando más del 50 % del total de los casos reportados en todo el mundo.

Las infecciones con tipos específicos de HPV de alto poder carcinogénico representan un factor de riesgo tanto para lesiones cervicales como para cáncer cervical invasivo (ICC). Investigaciones recientes han evaluado la asociación de variantes específicas de HPV 16 con la persistencia viral y el desarrollo de lesiones cervicales de alto grado, incluso se sugiere una asociación entre las variantes moleculares particulares de HPV y el riesgo de neoplasias cervicales, sin embargo, el papel que juegan las variantes virales en el desarrollo de lesiones cervicales o ICC por HPV 16 es aún incierto pues la caracterización de las secuencias y la identificación de las variantes es aun limitada.

Es claro que algunas variaciones en el genoma del HPV puedan ser determinantes de su conducta biológica, por lo tanto se requiere de más estudios para llegar al conocimiento biológico de las variantes intratipo de HPV 16 que nos permitan estimar el riesgo individual a la enfermedad de acuerdo con la variante y establecer la prevalencia de ciertas variantes del HPV en poblaciones específicas.

Recientes investigaciones de tipo epidemiológico proveen evidencia de que la mayoría de los casos con ICC están asociados a las variantes Europea (E) y Asiático Americana (AA) del HPV 16 en más del 90 % de las infecciones a nivel mundial, por lo que su oportuna identificación permitirá prever y agilizar los métodos de tratamiento de la enfermedad. Con la detección simplificada de variantes del HPV 16 se podrá distinguir cual de las infecciones puede progresar más rápidamente hacia el desarrollo de cáncer cervical de manera confiable en estudios epidemiológicos.

El progreso en la última década en genética y biología molecular, nos ha llevado al descubrimiento de novedosas técnicas para la síntesis, análisis y manipulación de los ácidos nucleicos, así los biochips de DNA (tipo genesensor) mediante hibridación en tandem hoy día representan nuevos y potentes métodos moleculares que hacen posible la identificación de mutaciones en el DNA que prometen revolucionar el estudio de los procesos celulares. Además, representan una técnica rápida, económica, sensible y confiable para detectar cambios sutiles en el DNA y que en nuestro caso será dirigido a la identificación de variantes del HPV-16 en muestras de cáncer cervico uterino y de esta manera proveer nuevos métodos diagnósticos y pronósticos de la enfermedad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

Utilizando la tecnología de biochips de DNA del tipo "genesensor" se podrá discriminar e identificar variantes del virus del papiloma humano 16.

OBJETIVO GENERAL

Diseñar e implementar un biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección molecular de las variantes Europea (E) y Asiático Americana (AA) del virus del papiloma humano tipo 16.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Amplificar tres fragmentos del gen E6 del virus de papiloma humano 16 utilizando tres pares de oligonucleotidos.
- 2.- Diseñar el biochip de DNA con oligonucleotidos específicos para detectar mutaciones puntuales del gen E6 del virus del papiloma humano 16 para la detección de las variantes Europea (E) y Asiático Americana (AA).
- 3.- Realizar la estandarización de la técnica del biochip de DNA (tipo genesensor) con DNA blanco sintético y posteriormente aplicarla a la detección de variantes virales a partir de DNA tumoral y líneas celulares positivos para HPV 16.
- 4.- Demostrar las mutaciones en el gen E6 por secuenciación automatizada de DNA.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo experimental.

5.1 Tejidos y muestras

Se trabajó con DNA tumoral y de una línea celular derivadas de cáncer cérvico uterino Caski positivas para el HPV tipo 16 las cuales fueron sujetas a la extracción y purificación de DNA genómico a través de procedimientos convencionales y de rutina. Las muestras de DNA tumoral sirvieron en la detección de la variante AA, mientras que Caski se utilizó en el caso de la variante E. Algunas de las muestras provenientes de DNA tumoral fueron secuenciadas con anterioridad (Piña, 2003), lo que de entrada nos permitió conocer su secuencia y con ello conocer no solo su tipo viral, sino que fue posible hacer una clasificación de las muestras hasta subvariantes de HPV 16 e incluso nos permitió seleccionar aquellas muestras que presentaban los cambios en la secuencia del gen E6 que distinguen a la variante AAa/c y AAc útiles a nuestros propósitos. Por otro lado, trabajar con Caski resultó de gran utilidad, en primer lugar, por que es una línea celular que puede contener en su genoma de 60-600 copias del HPV 16, pero la razón más importante por lo que fue conveniente su uso, es por que se reporta que Caski presenta la mutación 350 T→G que distingue a la variante EUR40-G de interés primordial en el presente proyecto (Meissner J., 1999).

Posteriormente se estandarizó la técnica para la amplificación de tres fragmentos del gen E6 que nos permitiría la identificación de las variantes virales AA y E de HPV 16.

5.2 Amplificación de un fragmento del gen E6 para la detección de la variante Asiático Americana (AA) del HPV 16 y subvariante c.

Un primer amplificado del gen E6 (A-1) corresponde a un producto de PCR de una longitud de 126 pares de bases (ntd 110 – 235). Los iniciadores usados en la amplificación de A-1 son los descritos por Terris and Peehl, 1997, los cuales corresponden (5' → 3') a los nucleótidos 110 – 131 y 235 –215 (ver Tabla 3). Este fragmento presenta las mutaciones puntuales que nos permiten identificar la variante Asiático Americana (AA) subvariante a ó c (ntd 145 G → T) y la subvariante c específicamente (ntd 183 T → G) desde el gen E6 del HPV 16 (Yamada, et. al., 1997). Las condiciones que se manejaron para A-1 se describen a continuación: el cocktail de PCR contenía 0.2 mM de los dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1 μM de cada uno de los iniciadores, 200 ng/μL de DNA molde como mínimo, 2.5 U de Taq polimerasa (Beckman , Brea CA) y Buffer 10 mM Tris HCL a pH 8.4. Las temperaturas programadas fueron: 94° C por 3 minutos seguida de desnaturalización a 94° C por 30 segundos, alineamiento a 55° C por 90 segundos

y una extensión a 72° C por 90 segundos repitiéndose lo anterior 40 ciclos, se permitió una extensión final a 72° C durante 7 minutos.

Una vez obtenido el amplificado A-1 desde las muestras positivas para HPV 16 se procedió a realizar síntesis cíclica de la cadena blanco a cada una de las muestras, tomando como DNA molde de 10–20 µl de la PCR normal y bajo las mismas condiciones de incubación. El iniciador usado en la producción de la cadena sencilla de interés fue de 5' → 3' CAG GAC CCA CAG GAG CGA CCC A (ntd 110 – 131). Cada amplificado fue visualizado en geles de agarosa al 1 %.

Al fragmento de amplificación A-1 de cada una de las muestras analizadas se les confirmó tanto secuencia, como las mutaciones de interés por medio de secuenciación automatizada de DNA de acuerdo a la técnica de BigDye de Perkin Elmer (Unidad Central de Instrumentación, CMN, SXXI-IMSS) (Piña, 2003).

5.3 Amplificación de un fragmento del gen E6 para la detección de la variante Europea (E) del HPV 16.

Un segundo amplificado del gen E6 (A-2) corresponde a un producto de PCR de 165 pares de bases de longitud (ntd 236 – 400). Los iniciadores usados en la amplificación de A-1 son los descritos por Bohm, et. al., 1993, los cuales corresponden de 5' → 3' a los nucleótidos 236 - 250 y 400 – 386 (ver Tabla 3, Figura 5). Este fragmento presenta las mutaciones puntuales que nos permiten identificar la variante Europea (ntd 350 T → G) en el gen E6 del HPV 16 (Yamada, et. al., 1997). Las condiciones que se manejaron para A-2 se describen a continuación: el cocktail de PCR contenía 0.2 mM de los dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 1 µM de cada uno de los iniciadores, 100 ng/µL de DNA molde como mínimo, 2.5 U de *Taq* polimerasa (Beckman , Brea CA) y Buffer 10 mM Tris HCL a pH 8.4. Las temperaturas programadas fueron: 95° C por 5 minutos seguida de desnaturalización a 95° C por 90 segundos, alineamiento a 43° C por 2 minutos y una extensión a 72° C por 2 minutos repitiéndose lo anterior 30 ciclos, se permitió una extensión final a 72° C durante 5 minutos.

Una vez obtenido el amplificado A-2 desde las muestras positivas para HPV 16 se procedió a realizar síntesis cíclica de la cadena blanco en cada una de las muestras, tomando como DNA molde de 10–20 µl de la PCR normal y bajo las mismas condiciones de trabajo que la PCR normal solo que en lugar de 30 ciclos de PCR se incubaron 40 ciclos. El iniciador usado en la producción de la cadena sencilla de interés fue de 5' → 3' TTT GCT TTT CGG GAT (ntd 236 – 250). Cada amplificado fue visualizado en geles de agarosa al 1 %.

Con el fin de optimizar la detección de la variante europea se procedió a amplificar un tercer fragmento del gen E6 (A-3) cuyo producto de PCR comprende un total 77 pares de bases (ntd 324 – 400). Los iniciadores usados en la

amplificación de A-3 corresponden de 5' → 3' a los nucleótidos 324 - 345 y 400 - 386 (Ver Tabla 3, Figura 5). Este fragmento al igual que A-2 presenta la mutación puntual que nos permite identificar la variante Europea (ntd 350 T → G) desde el gen E6 del HPV 16 (Yamada, et.al., 1997) solo que el tamaño por ser más pequeño que A-2 podría resultar más adecuado para detectar la variante. El iniciador usado en la producción de la cadena sencilla de interés fue de 5' → 3' TAA CAA TAA TGT CTA TAC TCA C (ntd 324-345).

Tabla 3. Iniciadores usados en la amplificación de tres regiones del gen E6 de HPV 16.
(Fuente: Bohm, et. al., 1993; Terris and Peehl., 1997)

Gen HPV 16	Variante	Mutación (ntd)	Nombre Amplificado	Longitud (pb)	ntd (5' → 3')	Secuencia
						(5' → 3')
E6	AA	145T ¹ 183G ²	A1	126	110-131	CAG CAC CCA CAG GAG CGA CCC A
					235-219	GTC ATA TAC CTC ACG TCG CAG
					236-250	TTT GCT TTT CGG GAT
	E	350G ³	A2	165	400-386	CAA ATC ACA CAA CCG
					324-345	TAA CAA TAA TGT CTA TAC TCA C
					400-386	CAA ATC ACA CAA CCG

¹ = AA subvariante a/c, ² = AA subvariante c, ³ = E subvariante E40-350G. ref = base referencia, mut = base mutante

5.4 Características del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de las variantes Asiático Americana (AA) y Europea (E) en el gen E6 de HPV 16.

En forma paralela a la amplificación del gen E6, se procedió al desarrollo de un microchip de DNA para identificar las mutaciones puntuales en las posiciones 145, 183 y 350 del gen E6 que distinguen a las variantes AA y E del HPV 16.

5.4.1 Oligonucleótidos sintéticos utilizados.

Todos los DNA de cadena sencilla: sondas con modificación 3' aminopropanol (9-10 pb), estabilizadores (19-29 pb) y DNA blancos de tipo silvestre (48-51 pb) fueron adquiridos de IDT, INC. e Invitrogen life technologies, la T4 polinucleótido cinasa de New England Biolabs y el $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (7,000 Ci/mmol, 100 mCi/ml) de ICN Radiochemicals, los filtros microcon-MY3 fueron obtenidos de Amicon (Beverly, MA).

5.4.1.1 Características de las sondas para detección de las variantes AA y E de HPV 16.

Las sondas contienen una modificación al extremo 3' de la sonda que consiste en una molécula aminopropanol la cual se unió químicamente durante su síntesis y cuya función es permitir la unión de la sonda a la matriz de soporte (portaobjeto) mediante la formación de un enlace covalente entre los grupos aminos de las sondas modificadas y los grupos silicatos de la superficie de la laminilla (Cheung, et. al., 1999).

La detección de cada una de las variantes a identificar requirió del diseño de dos sondas por cada una de las variantes, la primera distingue al tipo viral HPV 16 de referencia o tipo silvestre (wt), mientras que la segunda permite la detección de la variante viral de interés (mut) (ver Figura 5).

Así, para la variante AA se diseñaron dos sondas, una que detecta al HPV 16 de referencia wt-AAa/c y otra que distingue plenamente a la variante AA del HPV16 en cualquiera de sus subvariantes a, b ó c mut-AAa/c (5'-3' ntds 149-141). Dos sondas más fueron diseñadas para detectar y diferenciar específicamente a la subvariante c de la AA dada su frecuencia en la población mexicana y su posible papel en la carcinogenesis cervical. Una primera sonda al igual que la anterior distingue al HPV 16 de referencia wt-AAc, mientras que la segunda distingue a la subvariante c de cualquiera de las otras subvariantes de la AA mut- AAC (5'-3' ntds 188-179). El mismo diseño se aplicó a la detección de la variante Europea, la primer sonda distingue a la variante Europea 60-350T, en este caso tomada como variante de referencia desde HPV 16 wtE60-T, mientras que la segunda sonda reconoce a la variante Europea 40-350G de interés para nuestro proyecto mutE40-G). Una última sonda fue diseñada con el fin de detectar a la variante Africana del HPV 16 que sí bien no es frecuente en México, a nivel mundial es considerada una variante comúnmente presente en la población. La referencia silvestre de esta sonda es Af1/2.

El listado de las sondas que fueron fijadas al biochip de DNA se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Sondas sintéticas fijadas en el Biochip de DNA (tipo genesensor).

SECUENCIA	NOMBRE	TAMAÑO (NT)
* GTGTCAATA	wt - AAa/c	9
* GTGTAAATA	mut - AAa/c	9
* TATTATAATC	wt - AAC	10
* TATTCTAATC	mut - AAC	10
* ATCAAACAT	wtE60 - T	9
* ATCACACAT	mutE40 - G	9
* GTCTCAATA	Af1/2	9

* = Modificación aminopropanol al extremo 3' de la sonda.

Las letras en color resaltan la mutación puntual entre el gen E6 HPV 16 de referencia y la variante AA ó E:

Verde = silvestre, rojo = mutante.

5.4.1.2 Preparación de la matriz de soporte (portaobjetos) para el biochip de DNA (tipo genesensor).

Para preparar el chip de DNA se usó como matriz de soporte laminillas de microscopio convencionales (portaobjetos), sobre las cuales se depositaron las sondas sintéticas de DNA que contenían la secuencia interrogada. Las laminillas de microscopio se sometieron a un proceso de limpieza antes de la fijación de las sondas que consistió en sumergirlas 20 minutos en hexano, luego 20 minutos en etanol absoluto y se secaron posteriormente 5 horas a 90° C. Una vez limpias se guardaron en un lugar fresco al vacío hasta el momento de fijar las sondas.

5.4.1.3 Fijación de las sondas en el biochip de DNA (tipo genesensor).

Cada una de las sondas se diluyeron en agua inyectable a una concentración de 20 pmol/ μ l y se aplicaron 500 η L de cada una en hileras de cuatro gotitas para apreciar la reproducibilidad, en sitios diferentes sobre los portaobjetos como se muestra en la Figura 4 (mediante este procedimiento se obtiene una densidad de 10^{10} - 10^{11} moléculas/ mm^2 , correspondiendo a un espacio intermolecular de aproximadamente 30-100 $^{\circ}$ A (Beattie, et. al., 1995a; Beattie, et. al., 1995b). Debido al posible exceso de grupos aminos libres en las sondas producidos durante su síntesis, se procedió a realizar algunos experimentos con sondas previamente filtradas (sodas lavadas) y sondas sin filtrar (sondas sin lavar) en microcon-MY3, el cual permite eliminar este tipo de moléculas que podrían competir en algún momento con la sonda por los espacios libres y disminuir su densidad en el portaobjetos.

Una vez fijadas las sondas al portaobjetos se dejaron secar al aire libre y se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente. Antes de la hibridación cada laminilla se puso en contacto con un agente bloqueador (tripolifosfato 10 mM) durante 1 hora dejándose secar posteriormente al aire libre. Los diferentes patrones de distribución de las sondas sobre los portaobjetos se muestran en la figura 4.

Estos representan los genesensores que se utilizaron en las pruebas de hibridación.

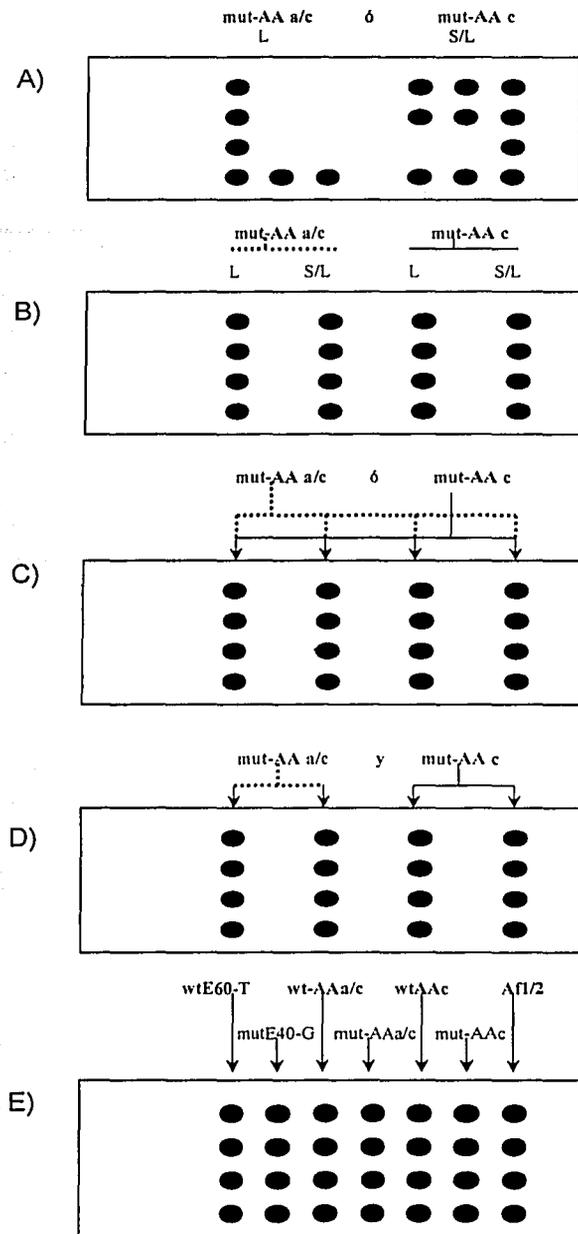


Figura 4. Distribución de las sondas en los portaobjeto.
 Las sondas fueron depositadas de diferentes formas según los patrones A, B, C, D y E.
 (L= sondas lavadas, S/L= sondas sin lavar, wt= sonda silvestre, mut= sonda mutante)

5.4.1.4 Características de los DNA blancos sintéticos de tipo silvestre y mutante que distinguen a las variante AA y E en el gen E6 del HPV 16.

Las secuencias de DNA blanco sintético de tipo silvestre (wt) y el DNA blanco sintético de tipo mutante (mut) corresponden a fragmentos de 48 y 51 nucleótidos de la secuencia del gen E6 de HPV 16. Los DNA blanco wt representan la secuencia del HPV 16 de referencia, es decir, no presentan las mutaciones que distinguen a las variantes AA y E desde el gen E6 de HPV 16, mientras que los DNA mut si las presentan. Las secuencias interrogadas tanto para DNA wt como DNA mut corresponden de 5' → 3' a los nucleótidos 121-168 para la variante AAa/c, nucleótidos 157-209 para la variante AAc y nucleótidos 326-375 para la variante E respectivamente. También se incluyeron las secuencias de DNA wt y mut que detectan a la variante Af y cuyas mutaciones caen en el área de la sonda que detecta a la variante AAa (mutación 143 del gen E6 del HPV 16). En la Tabla 5 y en la Figura 5 se muestran las características del diseño de ambas secuencias.

Tabla 5. Características de los DNA blancos sintéticos de tipo silvestre (wt) y mutante (mut) que distinguen a las variantes AA y E en el gen E6 de HPV 16.

DNA BLANCO SINTETICO GEN E6 HPV 16				
Secuencia wt 5'-3'			Nombre	Tamaño (ntd)
5'	GGAGCGACCCAGAAAGTTACCACA TTATGCCACAGAGCTGCAAACAAC	3'	*wtAAa/c	48
5'	GCTGCAAACAAC TATACATGATATAA ATTAGAATGTGTGCTACTGCAAGCA	3'	*wtAAc	51
5'	GAGTATAGACATTATTGTTATAGT TGTATGGAACAACATTAGAACAGCA	3'	*wtEUR60	50
5'	GGAGCGACCCAGAAAGTTN:CA A TTATGCCACAGAGCTGCAAACAAC	3'	*wtAf	48
Secuencia mut 5'-3'			Nombre	Tamaño (ntd)
5'	GGAGCGACCCAGAAAGTTACCACATTTATGCCACAGAGCTGCAAACAAC	3'	*mutAAa/c	48
5'	GCTGCAAACAAC TATACATGATATAAGATTAGAATGTGTGCTACTGCAAGCA	3'	*mutAAc	51
5'	GAGTATAGACATTATTGTTATAGTGTGTATGGAACAACATTAGAACAGCA	3'	*mutEUR40	50
5'	GGAGCGACCCAGAAAGTTACCAGAGTTATGCCACAGAGCTGCAAACAAC	3'	*mutAf	48

En la Tabla 5, el nucleótido presente en la secuencia de referencia del HPV 16. En rojo el nucleótido que distingue a las variantes AA y E del HPV 16

5.4.1.5 Características de los estabilizadores sintéticos prealineados al DNA blanco que distingue a las variante AA y E en el gen E6 del HPV 16.

Con la finalidad de incrementar la especificidad de la hibridación entre el DNA blanco de interés (wt o mut) y las sondas de detección para las variantes AA y E desde el gen E6 del HPV 16 se implemento el uso de estabilizadores. Los estabilizadores consistieron en secuencias de DNA de cadena sencilla de 19-29 nucleótidos de longitud, cuyas secuencias son 100% complementarias al DNA blanco de interés (silvestre y mutante), formando un hueco de cadena sencilla en el DNA blanco cuya secuencia será investigada por la sonda.

En el caso de la variante AAa/c y AAc se diseñaron un total de tres estabilizadores. El primer estabilizador denominado 1I-AAa/c (5' → 3' ntds 140-121) corresponde a la secuencia complementaria del extremo izquierdo del DNA blanco sintético como del amplificado de DNA tumoral. El segundo estabilizador denominado 1C-AAa/c (5' → 3' ntds 178-150) corresponde en parte a la secuencia complementaria del extremo derecho del DNA blanco sintético (wt y mut), mientras que en el amplificado de DNA tumoral corresponde completamente a la secuencia complementaria en la parte central que flanquea por un lado a la mutación 145 y por el otro a la 183. El tercer estabilizador denominado 1D-AAc (5' → 3' ntds 209-189) corresponde a la secuencia complementaria del extremo derecho tanto del DNA blanco sintético (wt y mut) como del amplificado de DNA tumoral (Ver Tabla 6, Figura 5).

Dos estabilizadores más fueron diseñados para la variante Europea. El primero denominado 2I-EUR (5'-3' ntds 345-326) corresponde a la secuencia complementaria del extremo izquierdo tanto del DNA blanco sintético (wt y mut) como del amplificado de Caski. El segundo estabilizador denominado 2D-EUR (5'-3' ntds 375-355) corresponde a la secuencia complementaria del extremo derecho tanto del DNA blanco sintético (wt y mut) como del amplificado de Caski (ver Tabla 6, Figura 5).

Tabla 6. Características de los estabilizadores sintéticos prealineados al DNA blanco que distingue a las variantes AA y E en el gen E6 de HPV 16.

ESTABILIZADORES SINTETICOS						
	Secuencia	5-3'	Nombre	Tamaño (nt)		
5'	GTAAC	TTCTGGG	TGCTCC	3'	1I-AAa/c	20
5'	ATCA	TGTATAGTTG	TTGCAGCTCTGTGC	3'	1C-AAa/c	29
5'	TGCT	TGCAGTACAC	AATT	3'	1D-AAc	19
5'	TAACA	ATAATGCTCT	TACTC	3'	2I-EUR	22
5'	TGCT	GTCTAATG	TGTTCCA	3'	2D-EUR	21

5.4.1.5.1 Marcaje de los estabilizadores con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$.

Un método conveniente para introducir una marca al DNA blanco de interés además de proporcionarle estabilidad fue el marcaje de cada uno de los estabilizadores con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ utilizando la enzima T4 polinucleótido cinasa (Maniatis, 1989) para ello se usó la mezcla de reacción que se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7. Marcaje de los estabilizadores con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
Estabilizador "X" (30 pmol/ μL)	1.0
Regulador para T4 polinucleotidocinasa (10X)	3.0
Agua (ampolleta)	24.0
T4 polinucleótido cinasa 10, 000 UI/ μL	1.3
$\gamma^{32}\text{P-ATP}$ (7, 000 Ci/mmol)	1.3

X= 1I-AAa/c, 1C-AAa/c, 1D-AAc, 2I-EUR, 2D-EUR.

La mezcla de reacción se incubó durante 1 hora a 37°C, transcurrido el tiempo se detuvo la reacción por adición de 2.5 μL de EDTA 0.5 M.

5.4.2 Alineación del DNA blanco con los estabilizadores: formación del duplex parcial.

Los estabilizadores previamente marcados con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ fueron prealineados al DNA blanco, tanto al sintético (wt y mut) como al producto de PCR de cadena sencilla (tumoral y Caski) para crear el sitio de contigüidad durante la unión de la sonda en la mezcla de reacción enunciada en la Tabla 8.

Tabla 8. Mezcla de reacción para la alineación del DNA blanco con los estabilizadores.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
SSC (20X)	50.0
Tris 1 M pH 8.0	10.0
EDTA 0.5 M	3.0
Agua (ampolleta)	4.0
$^{\circ}\text{DNA}$ blanco de cadena sencilla (20 pmol/ μL)	6.0
*Estabilizador marcado $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ (30 pmol/ μL)	2.0

*= Se prealinea un solo DNA blanco a la vez, cada uno con sus respectivos estabilizadores.

*= Mezcla de reacción de marcaje de cada uno de los estabilizadores.

La mezcla de reacción para cada uno de los DNA blancos se incubó en un termociclador Minicycler a 95°C por 5 minutos; 45°C durante 5 minutos y 6 °C por 5 minutos.

Una vez realizada esta etapa, se procedió a eliminar el exceso de $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ de cada una de las muestras prealineadas mediante centrifugación en tubos Microcon-MY3. El volumen total de cada una de las muestras se vació al tubo Microcon-MY3 y se centrifugó durante 15 minutos. Posteriormente, cada muestra se lavó 2 veces agregando en cada ocasión 200 μL de SSC 1X y se centrifugó nuevamente hasta obtener un volumen final aproximado de 20 μL . Las muestras una vez prealineadas y lavadas se conservaron a -20°C hasta el momento de su hibridación en el genesensor.

5.4.3 Reacción de Hibridación.

Las hibridaciones entre el DNA blanco prealineado a los estabilizadores marcados con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ sobre los genesensores se realizaron en solución de Cloruro de tetrametil amonio (TMAC) 5 M contenido en la mezcla de reacción enlistada en la Tabla 9.

Tabla 9. Mezcla de reacción para la Hibridación.

REACTIVO	VOLUMEN (μL)
TMAC 5 M	118.8
SDS 10%	1.8
Tris 1M pH 8.0	9.0
EDTA 0.5 M	0.72
PEG 40%	14.4
Agua (ampolleta)	35
*Mezcla de alineación	20

*= Se agrego todo el volumen obtenido del lavado en Microcon-MY3.

Se adicionaron 35-40 μL de la mezcla de hibridación sobre cada uno de los genesensores, se colocó sobre ellos un cubreobjetos en el área de las sondas evitando la formación de burbujas y se incubaron durante 4 horas a 25°C de temperatura en un ambiente húmedo. Al finalizar la incubación, se retiró el cubreobjetos de cada genesensor con la ayuda de unas pinzas metálicas, se lavo con la solución de hibridación sin PEG y se dejó secar a temperatura ambiente.

5.4.4 Autoradiografía.

Cada uno de los genesensores sometidos a hibridación, una vez secos se envolvieron en plástico (plastipack) y se colocaron en un cassette donde se expusieron a una película fotográfica durante diferentes periodos de tiempo que fueron desde 1 hasta 14 días. Una vez transcurrido el tiempo de exposición se revelaron las películas, se detectaron señales sobre los genesensores en el área de las sondas con ayuda de un densitómetro fotoeléctrico Photovolt modelo 52C y finalmente se midió la intensidad de las señales mediante el programa ScanAlyse.

5.4.5 Programas computacionales a utilizar en el diseño del Biochip de DNA (tipo genesensor).

Diversos programas fueron utilizados en el diseño del biochip de DNA tipo genesensor. El diseño de las sondas, de los DNA blancos y los estabilizadores se realizó con la ayuda del programa Genosensor probe designer (Méndez- Tenorio, et. al., 2003). El diseño y funcionalidad de los iniciadores a utilizar en la amplificación de los fragmento A1, A2 y A3 desde el gen E6 del HPV 16 se realizó en el programa Virtual Hybridization (Reyes-López, et. al., 2003). Ambos programas propiedad industrial del Mtro. Alfonso Mendez Tenorio y del Dr. Rogelio Maldonado Rodríguez miembros del departamento de Bioquímica de la ENCB-IPN y cuya finalidad radica en la optimización de las condiciones de detección específica de secuencias.

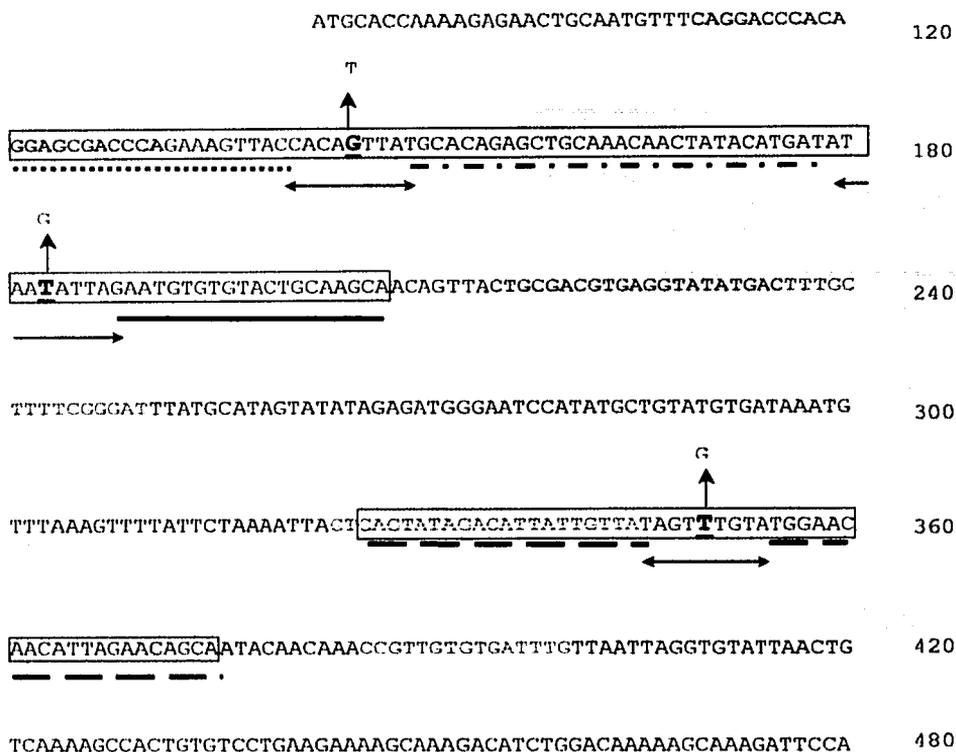


Figura 5. Estrategia general para la detección de las variantes AA y E del HPV 16.

Se muestra la secuencia silvestre del gen E6 del HPV 16 en (5' → 3' ntd: 83-480). Las letras intensificadas en **negritas** corresponden a los puntos de mutación que distinguen a las variantes AA y E. Las flechas de una punta en vertical (↑) señalan la base presente en la variante correspondiente la cual es intensificada en rojo. Dentro del **rectángulo** se enmarcan las secuencias de los DNA blanco sintético. Con líneas discontinuas (---) se indican los sitios de reconocimiento por los oligonucleótidos estabilizadores. Las flechas de doble punta en horizontal (↔) corresponden a las regiones investigadas por las sondas. Las letras intensificadas de 5' → 3' en azul corresponden a la secuencia de un primer juego de iniciadores cuyo amplificado fue denominado A1, en cambio un segundo par de iniciadores cuyo amplificado fue denominado A2 y por último las letras verdes y las últimas verdes comprendieron un tercer par de iniciadores cuyo amplificado fue A3. El amplificado A1, se uso para la detección de la variante AA subvariantes a y c, mientras que los amplificados A2 y A3 se usaron para la detección de la variante E.

RESULTADOS

6.1 Diseño de los biochips de DNA (tipo genesensor) para la detección de las variantes AA y E del HPV 16.

Un primer paso en el diseño del biochip de DNA tipo genesensor fue el trabajar con DNA sintético que simulan fragmentos cortos de la secuencia de interés del gen E6 del HPV (DNA blanco), tanto de la secuencia silvestre (wt) como de la mutante (mut). Posteriormente el mismo análisis fue aplicado pero ahora a muestras provenientes de DNA tumoral y a la línea celular Caski ambas positivas para HPV 16.

A continuación se describe en detalle cada uno de los diseños manejados en la detección de las variantes virales AA y E a partir del gen E6 del HPV tipo 16.

6.1.1 Diseño del biochip de DNA tipo genesensor para la detección de la variante AAa/c en el gen E6 del HPV 16.

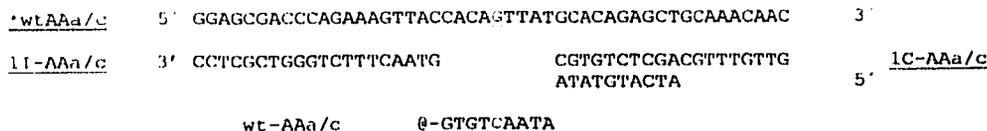
6.1.1.1 Análisis del DNA blanco sintético.

El diseño comprende dos secuencias de DNA blanco de 48 ntd (5' → 3' ntds 121-168), la primera es exactamente igual al DNA de HPV 16 de referencia o tipo silvestre (*wtAAa/c), la segunda presenta una mutación puntual en el nucleótido 145 que distingue a la variante AAa/c (°mutAAa/c) de otras variantes de HPV 16. Los mismos dos estabilizadores marcados con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ (1I-AAa/c y 1C-AAa/c) fueron requeridos para cada uno de los DNA blancos (wt y mut) cuya finalidad fue flanquear ambos extremos dejando libre solo el área donde se registra el cambio de base o área de la sonda. Dos sondas más de 9 ntd con una modificación 3'aminopropanol (5' → 3'ntds 141-149) fueron sintetizadas con la secuencia complementaria de cada una de las secuencias de DNA blanco. Durante el proceso de hibridación, la primera sonda denominada wt-AAa/c, reconocerá a la secuencia silvestre del HPV 16, mientras que la segunda sonda denominada mut-AAa/c reconocerá a la secuencia mutante.

El diseño general del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAa/c del HPV 16 con DNA blanco sintético se esquematiza en la Figura 6.

Silvestre

ntd-145

**Mutante**

ntd-145

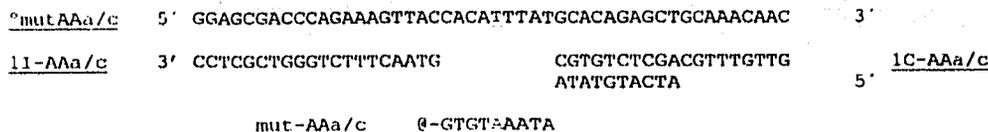


Figura 6. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAa/c del HPV 16 con DNA blanco sintético.

6.1.1.2 Análisis con DNA blanco tumoral.

La detección de la variante AA del HPV 16 comprende el diseño de un par de iniciadores (5' → 3' ntds 110-131; 236-217) en el gen E6, cuyo producto de PCR fue de 126 pb denominado A1 el cual permite identificar posibles mutaciones en el nucleótido 145 (G→T) que distingue a la variante AA del HPV 16 prototipo. Con la finalidad de incrementar el número de copias del DNA blanco, A1 se sometió a síntesis cíclica. Después, A1 se prealineó en cada extremo con los oligonucleótidos estabilizadores marcados con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ (1I-AAa/c y 1C-AAa/c) cuya secuencia es complementaria a el DNA blanco en las regiones 5' → 3' ntds 178-150: 140-121, dejando expuestos los ntds 141-149 de A1 cuya secuencia será investigada por las sondas. Una vez que A1 se prealineó a los estabilizadores $\gamma^{32}\text{P-ATP}$, se sometió a su hibridación sobre el genesensor, donde dos sondas reconocerán (por ser secuencia 100% complementaria) a un fragmento de 9 ntd dentro de A1 (5' → 3' ntds 141-149). Durante el proceso de hibridación, la secuencia silvestre del HPV 16 fue detectada con la sonda wt-AAa/c, mientras que la mutante, en este caso variante AAa/c del HPV 16 fue detectada con la sonda mut-AAa/c.

El diseño general del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAa/c del HPV 16 en DNA blanco tumoral se esquematiza en la Figura 7.

Silvestre**A1**

ntd-145

5' CAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATGCACAGAGCTGCAAACAACATA
1I-AAa/c CCTCGCTGGGTCTTTCAATG CGTGTCTCGACGTTTGTGGATAT
 @-GTGTCAATA wt-AAa/c

CATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGAC 3'
 GTACTA 1C-AAa/c

Mutante**A1**

ntd-145

5' CAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACATTTATGCACAGAGCTGCAAACAACATA
1I-AAa/c CCTCGCTGGGTCTTTCAATG CGTGTCTCGACGTTTGTGGATAT
 @-GTGTAAATA mut-AAa/c

CATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGAC 3'
 GTACTA 1C-AAa/c

Figura 7. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAa/c del HPV 16 en DNA blanco tumoral.

6.1.2 Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAc en el gen E6 del HPV 16.

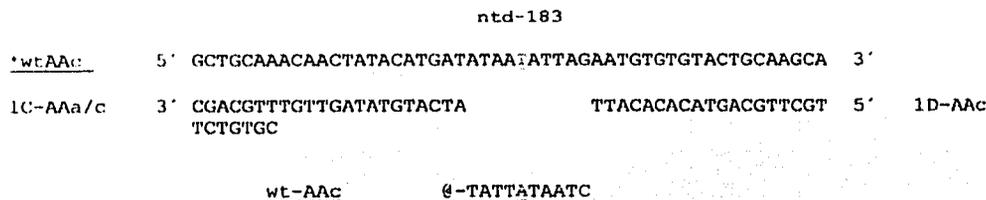
6.1.2.1 Análisis del DNA blanco sintético.

El diseño comprende dos secuencias de DNA blanco de 51 ntd (5' → 3' ntds 157-209), la primera es exactamente igual al DNA de HPV 16 de referencia o tipo silvestre (*wtAAc), la segunda presenta una mutación puntual en el nucleótido 183 que distingue a la variante AAc (°mutAAc), de otras variantes de HPV 16. Los mismos dos estabilizadores marcados con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ fueron requeridos para cada uno de los DNA blancos (wt y mut) denominados 1C-AAa/c y 1D-AAc, cuya finalidad fue flanquear ambos extremos dejando libre solo el área donde se registra el cambio de base o área de la sonda. Dos sondas más de 10 ntd con una modificación 3'aminopropanol (5' → 3'ntds 179-188) fueron sintetizadas con la

secuencia complementaria de cada una de las secuencias de DNA blanco. Durante el proceso de hibridación, la primera sonda denominada wt-AAa/c reconocerá a la secuencia silvestre del HPV 16, mientras que la segunda denominada mut-AAa/c reconocerá a la secuencia mutante.

El diseño general del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAc del HPV 16 con DNA blanco sintético se esquematiza en la Figura 8.

Silvestre



Mutante

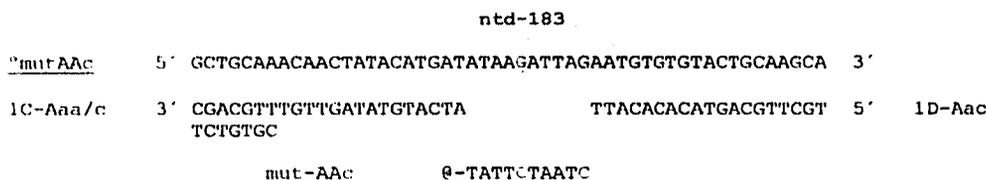


Figura 8. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAc del HPV 16 con DNA blanco sintético.

6.1.2.2 Análisis con DNA blanco tumoral.

La detección de la variante AAc del HPV 16 comprendió el diseño de un par de iniciadores (5' → 3' ntds 110-131; 236-217) en el gen E6, cuyo producto de PCR fue de 126 pb denominado A1 el cual permite identificar posibles mutaciones en el nucleótido 183 (T→G) que distingue a la variante AAc del HPV 16. Con la finalidad de incrementar el número de copias del DNA blanco, A1 se sometió a síntesis cíclica. Después, A1 se prelineó en cada extremo con los oligonucleótidos estabilizadores marcados con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ (1C-AAa/c y 1D-AAc) cuya secuencia es complementaria a el DNA blanco en las regiones 5' → 3' ntds 178-150: 209-189, dejando expuestos los ntds 179-188 de A1 cuya secuencia será investigada

por las sondas. Una vez que A1 se prealineó a los estabilizadores $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ fue sometido a su hibridación sobre el genesensor, donde dos sondas reconocen (por ser secuencia 100% complementaria) a un fragmento de 10 ntd dentro de A1 (5' → 3' ntds 179-188). Durante el proceso de hibridación, la secuencia silvestre del HPV 16 fue detectada con la sonda wt-AAC, mientras que la mutante, en este caso variante AAC del HPV 16 fue detectada con la sonda mut-AAC.

El diseño general del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAC del HPV 16 en DNA tumoral se esquematiza en la Figura 9.

Silvestre

A1

```

5' CAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACACTTATGCACAGAGCTGCAACAACACTATA
    1C-AAa/c                                CGTGTCTCGACGTTTGTGGATAT
                                     ntd-183
CATGATATAACATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATG 3'
GTACTA          TTACACACATGACGTTTCGT                                1D-AAC
@-TATTATAATC                                                    wt-AAC

```

Mutante

A1

```

5' CAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACACTTATGCACAGAGCTGCAACAACACTATA
    1C-AAa/c                                CGTGTCTCGACGTTTGTGGATAT
                                     ntd-183
CATGATATAACATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTTACTGCGACGTGAGGTATATGAC 3'
GTACTA          TTACACACATGACGTTTCGT                                1D-AAC
@-TATTCTAATC                                                    mut-AAC

```

Figura 9. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante AAC del HPV 16 en DNA blanco tumoral.

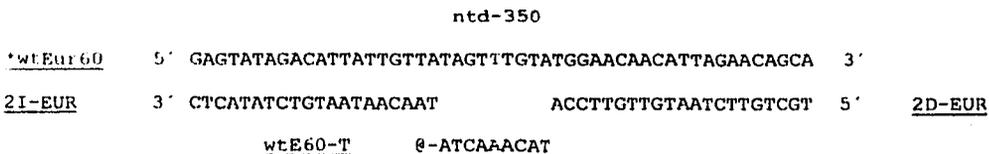
6.1.3 Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E en el gen E6 del HPV 16.

6.1.3.1 Análisis del DNA blanco sintético.

El diseño comprende dos secuencias de DNA blanco de 50 pb (5'-3' ntds 326-375), la primera es exactamente igual al DNA de HPV 16 de referencia o tipo silvestre (*wtEUR60), la segunda presenta una mutación puntual en el nucleótido 350 que distingue a la variante (°mutEUR40) de otras variantes de HPV 16. Dos estabilizadores marcados con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ fueron requeridos para cada uno de los DNA blancos (wt y mut) denominados 2I-EUR y 2D-EUR, cuya finalidad fue flanquear ambos extremos dejando libre solo el área donde se registra el cambio de base o área de la sonda. Dos sondas más de 9 ntd con una modificación 3'aminopropanol (5' → 3'ntds 346-354) fueron sintetizadas con la secuencia complementaria de cada una de las secuencias de DNA blanco. Durante el proceso de hibridación, la primera sonda (wtE60-T) reconoce a la secuencia silvestre del HPV 16, mientras que la segunda sonda (mutE40-G) reconoce a la secuencia mutante.

El diseño general del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E del HPV 16 con DNA sintético se esquematiza en la Figura 10.

Silvestre



Mutante

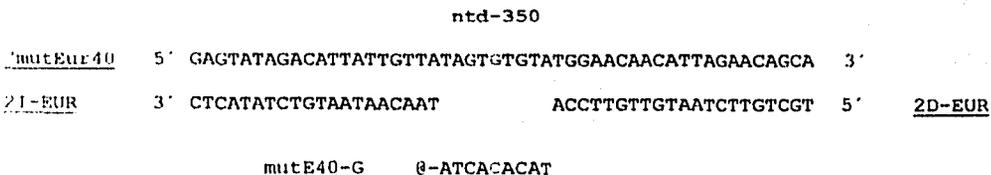


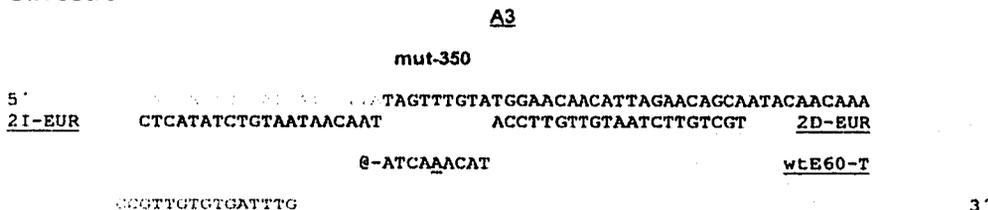
Figura 10. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E del HPV 16 con DNA blanco sintético.

6.1.1.2 Análisis con DNA blanco tumoral.

La detección de la variante E del HPV 16 comprende el diseño de dos pares de iniciadores (5' → 3' ntds A2→ 236-250; 399-385 y A3→ 324-345;399-385) en el gen E6 cuyos productos de PCR son de 165 y 77 pb denominados A2 y A3 respectivamente, este último fue diseñado con la finalidad de hacer más específica la detección de la variante E. Tanto A2 como A3 permiten identificar posibles mutaciones en el nucleótido 350 (T→G) que distingue a la variante E40-G de la variante E60-T del HPV 16. Ambos productos se prealinearon en cada extremo a dos oligonucleótidos estabilizadores marcados con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ denominados 2I-EUR y 2D-EUR cuya secuencia fue complementaria a ambos extremos de A2 y A3 (5'-3'ntds 345-326; 375-355). Una vez que A2 y A3 se prealinearon a los estabilizadores $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ fueron sometidos a su hibridación sobre el genesensor, donde dos sondas reconocieron (por ser secuencia 100% complementaria) a un fragmento de 9 ntd dentro de A2 y A3 (5'-3'ntds 346-354). Durante el proceso de hibridación, la secuencia silvestre del HPV 16 fue detectada con la sonda wtE60-T, mientras que la mutante, en este caso variante E40-G fue detectada con la sonda mutE60-G.

El diseño general del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E del HPV 16 en DNA tumoral se esquematiza en la Figura 11 para A3 y en la Figura 12 para A2.

Silvestre



Mutante

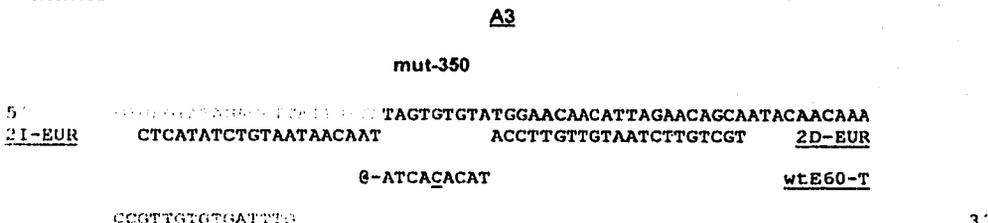


Figura 11. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E del HPV 16 en DNA blanco tumoral: con A3.

Silvestre**A2**

5' TTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAA
 ntd-350
 TGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGT'TGTATGGAACA
2I-EUR CTCATATCTGTAATAACAAT ACCTTGT
wtE60-T @-ATCAAACAT
 ACATTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTGTGATTTG 3'
 TGTAATCTTGTCGT 2D-EUR

Mutante**A2**

5' TTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATGGGAATCCATATGCTGTATGTGATAAA
 ntd-350
 TGTTTAAAGTTTTATTCTAAAATTAGTGAGTATAGACATTATTGTTATAGT'TGTATGGAACA
2I-EUR CTCATATCTGTAATAACAAT ACCTTGT
mutE60-T @-ATCACACAT
 ACATTAGAACAGCAATACAACAAACCGTTGTGTGATTTG 3'
 TGTAATCTTGTCGT 2D-EUR

Figura 12. Diseño del biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E del HPV 16 en DNA blanco tumoral: con A2.

6.2 Detección de las variantes AA y E del HPV 16 mediante el biochip de DNA (tipo genesensor).

Una vez realizado el diseño para la detección de las variantes AA y E del HPV 16 de acuerdo con la secuencia viral del gen E6, se procedió a simular el proceso de hibridación sobre el genesensor por medio de hibridación virtual con la finalidad de evaluar el diseño propuesto para la detección de cada una de las variantes virales. Una vez que se probó el diseño de manera virtual, se realizaron las hibridaciones reales, tanto con el DNA blanco sintético, como con el DNA blanco proveniente de muestras de pacientes con cáncer cervical tipificados como positivos para HPV 16.

Un total de siete muestras fueron sometidas al proceso de hibridación las cuales incluyen: dos muestras que fueron usadas como controles positivos por provenir de HPV 16 de líneas celulares cervicales, clonado y cuya secuencia abarca completamente al gen E6 del HPV de referencia (W1 y W2), cuatro muestras más de DNA tumoral fueron obtenidas de pacientes con cáncer cervical invasor (secuenciadas M1 y M2; sin secuenciar M3 y M4) y una última muestra comprende al DNA extraído de la línea celular Caski positiva para HPV 16 (M5).

La detección de cada una de las variantes virales se realizó por separado y con por lo menos un genesensor extra como duplicado durante el proceso de hibridación, tanto para el DNA sintético como para el DNA tumoral.

6.2.1 Detección de la variante AAa/c en el gen E6 del HPV 16 con DNA blanco sintético.

La detección de la variante AAa/c se realizó mediante la hibridación de DNA blanco sintético de tipo silvestre sobre los genesensores como se muestra a continuación.

El primer ensayo comprendió la hibridación del DNA blanco mutante (^omutAAa/c) sobre los genesensores cuyo patrón de fijación de las sondas (según Figura 4D) contenían solo la secuencia 100% complementaria a dicho fragmento (mut-AAa/c), es decir solo la sonda mutante respectiva en cada genesensor para cada uno de los DNAs blancos - estabilizadores $\gamma^{32}\text{P-ATP}$. Dichas hibridaciones nos permitieron observar la afinidad de la sonda por su secuencia blanco 100 % complementaria (ver Figura 13B), sin embargo, hacía falta evaluar su especificidad en presencia de otras sondas u otras secuencias blanco, por lo que se propuso un segundo ensayo.

El segundo ensayo comprendió la hibridación del DNA blanco sintético, tanto el de secuencia silvestre (^{*}wtAAa/c), como el de secuencia mutante (^omutAAa/c) sobre los genesensores que contenían las 7 sondas 3'-aminolink según el patrón E de la Figura 4 el cual presenta el total de las sondas diseñadas para ambas variantes. En este caso el uso de DNA sintético produjo hibridaciones altamente

específicas registrándose señal solo en aquellos sitios donde las secuencias de DNA blanco y las sondas eran 100% complementarias, por lo que el DNA blanco silvestre *wtAAa/c y la sonda wt-AAa/c registran hibridación en el sitio esperado (carril 3, Figura 14C), al igual que el DNA blanco mutante °mutAAa/c con su respectiva sonda mut-AAa/c (carril 4, Figura 14D).

6.2.2 Detección de la variante AAC en el gen E6 del HPV 16 con DNA blanco sintético.

La detección de la variante AAC se realizó de la misma manera que para la variante AAa/c solo que con las secuencias respectivas.

El primer ensayo comprendió la hibridación del DNA blanco mutante (°mutAAc) sobre los genesensores cuyo patrón de fijación de las sondas (según Figura 4D) contenían solo la secuencia 100% complementaria a dicho fragmento (mut-AAc), es decir solo la sonda mutante respectiva en cada genesensor para cada uno de los DNAs blancos - estabilizadores $\gamma^{32}\text{P-ATP}$. Dichas hibridaciones nos permitieron observar la afinidad de la sonda por su secuencia blanco 100 % complementaria (ver Figura 13C), sin embargo hacía falta evaluar su especificidad en presencia de otras sondas u otras secuencias blanco, por lo que se propuso un segundo ensayo.

El segundo ensayo comprendió la hibridación del DNA blanco sintético, tanto el de secuencia silvestre (*wtAAc), como el de secuencia mutante (°mutAAc) sobre los genesensores que contenían las 7 sondas 3'-aminolink según el patrón E de la Figura 4, el cual presenta el total de las sondas diseñadas para ambas variantes. En este caso el uso de DNA sintético resulto en hibridaciones altamente específicas registrándose señal solo en aquellos sitios donde las secuencias de DNA blanco y las sondas eran 100% complementarias, por lo que el DNA blanco silvestre *wtAAc y la sonda wt-AAc registran hibridación en el sitio esperado (carril 5, Figura 14E), al igual que el DNA blanco mutante °mutAAc con su respectiva sonda mut-AAc (carril 6, Figura 14F).

6.2.3 Detección de la variante E en el gen E6 de HPV 16 con DNA blanco sintético.

La detección de la variante E se realizó de la misma manera que para la variante AAa/c y AAC solo que con las secuencias respectivas.

El primer ensayo comprendió la hibridación del DNA blanco mutante (°mutEUR40) sobre los genesensores cuyo patrón de fijación de las sondas (según Figura 4D) contenían solo la secuencia 100% complementaria a dicho fragmento (mut-E40G), es decir solo la sonda mutante respectiva en cada genesensor para cada uno de los DNAs blancos - estabilizadores $\gamma^{32}\text{P-ATP}$. Dichas hibridaciones nos permitieron observar la afinidad de la sonda por su

secuencia blanco 100 % complementaria (ver Figura 13A), sin embargo hacía falta evaluar su especificidad en presencia de otras sondas u otras secuencias blanco, por lo que se propuso un segundo ensayo.

El segundo ensayo comprendió la hibridación del DNA blanco sintético, tanto el de secuencia silvestre (*wtEUR60), como el de secuencia mutante (°mutEUR40) sobre los genesensores que contenían las 7 sondas 3'-aminolink según el patrón E de la Figura 4, el cual presenta el total de las sondas diseñadas para ambas variantes. En este caso el uso de DNA sintético resultó en hibridaciones altamente específicas registrándose señal solo en aquellos sitios donde las secuencias de DNA blanco y las sondas eran 100% complementarias, por lo que el DNA blanco silvestre *wtEUR40 y la sonda wt-E60T registran hibridación en el sitio esperado (carril 2, Figura 14A), al igual que el DNA blanco mutante °mutEUR40 con su respectiva sonda mut-E40G (carril 2, Figura 14B).

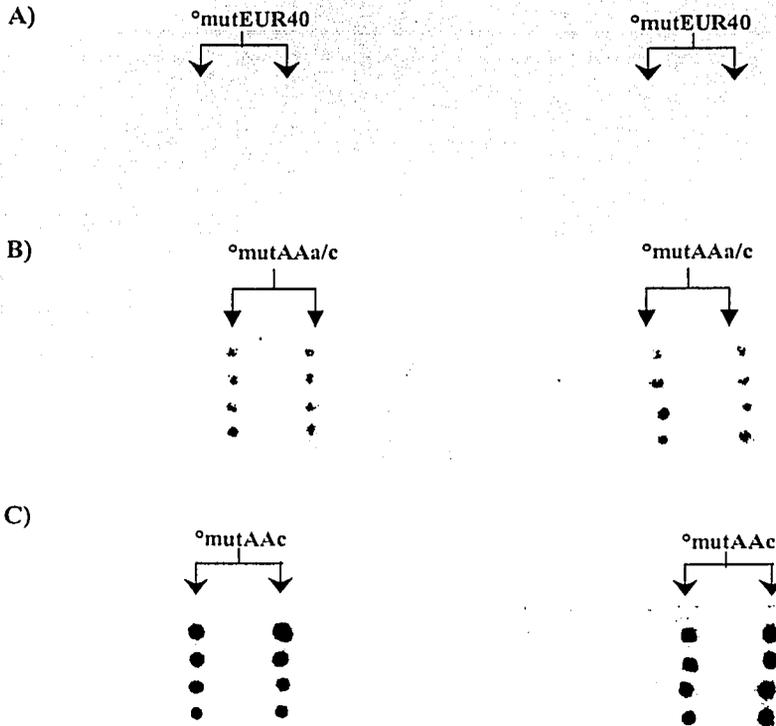


Figura 13. Detección de las variantes AA, AAc y E del HPV 16 por hibridación del DNA blanco sintético mutante sobre los genesensores (Distribución de sondas Figura 4D-Solo sonda mutante: A) variante E, B) variante AAa/c, C) variante AAc).

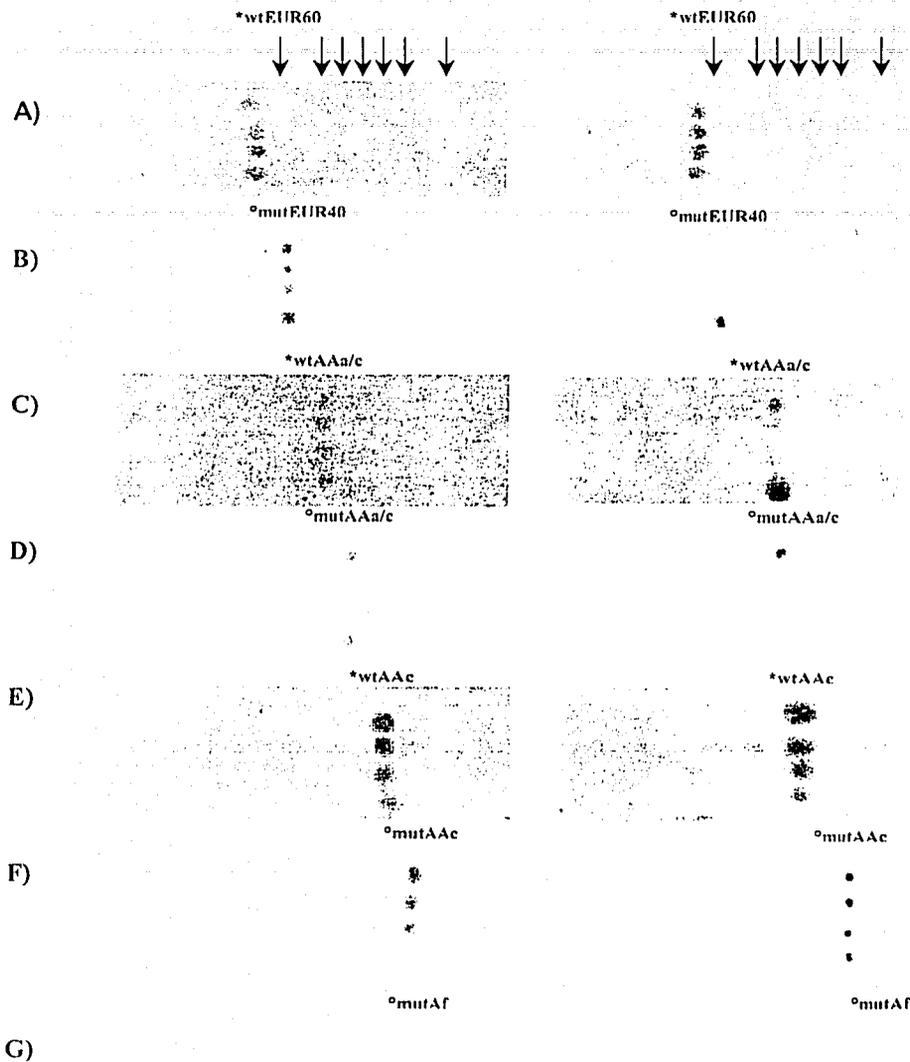


Figura 14. Detección de las variantes AA, AAC y E del HPV 16 por hibridación del DNA blanco sintético sobre los genesensores (Distribución de sondas Figura 4E-Todas las sondas: Variante E; A) silvestre y B) mutante. Variante AA; C) silvestre y D) mutante. Variante AAC; E) silvestre y F) mutante. Variante Af; G) mutante.

6.2.4 Detección de la variante AAa/c y AAc desde el gen E6 de HPV 16 con DNA Tumoral.

Una vez probada la funcionalidad del biochip de DNA (tipo genesensor) en la detección de las variantes virales AA y E del HPV 16 desde secuencias sintéticas, se procedió a someter directamente a hibridación sobre los genesensores los productos de PCR obtenidos desde el gen E6 de las muestras obtenidas de pacientes con cáncer cervical invasor positivas para HPV 16.

Diversos experimentos fueron realizados para probar la funcionalidad del genesensor en la detección de las variante AAa/c y AAc desde muestras reales de origen tumoral.

Un primer experimento consistió en someter a hibridación sobre los genesensores (según la Figura 4E) los amplificados A1 procedentes de los productos de PCR de las muestras W1, W2, M1, M2, M3 y M4. Las primeras muestras en someterse a los procesos de hibridación fueron los controles positivos W1 y W2 cuyas muestras procedían de DNA de HPV 16 de tipo silvestre clonado y cuyas señales positivas se registraron solo en aquellos sitios donde se fijaron las sondas de tipo silvestre wt-AAa/c y wt AAC respectivamente, lo que además confirma que efectivamente el DNA clonado es realmente de tipo silvestre. Dos muestras previamente secuenciadas representan; M1 a la variante AAa/c y M2 a la variante AAc, es decir, la primera registra la mutación 145 G→T, mientras que la segunda presenta ambas mutaciones la 145 G→T y la 183 T→G lo que distingue a cada una de las variantes virales. Tanto M1 como M2 sirvieron para comprobar la funcionalidad y especificidad del genesensor en la detección de las variantes AAa/c y AAc durante el proceso de hibridación dando señal positiva en aquellos sitios donde se fijaron las sondas de secuencia mutante que distinguen a cada una de estas variantes (mut-AAa/C y mut AAC respectivamente). También las muestras M3 y M4 fueron sometidas al proceso de hibridación sobre los genesensores, solo que a diferencia de M1 y M2, de estas muestras no se conocía la secuencia del amplificado solo se sabía por referencia del donante que eran positivas para HPV 16. Una vez realizada las hibridaciones de M3 y M4 sobre los genesensores resultaron ser positivas para HPV 16 de tipo silvestre, es decir, dieron señal positiva en aquellos sitios donde se depositaron las sondas de tipo silvestre wt-AAa/c y wt-AAC, es decir en los mismos sitios que W1 y W2. Los resultados obtenidos de cada una de estas hibridaciones se muestran en las Figuras 15 y 16 a diferentes periodos de exposición de la placa radiográfica cuya finalidad de reexposición fue la de evidenciar mejor las hibridaciones de cada una de las muestras además de detectar posibles hibridaciones inespecíficas a tiempos más largos de exposición de la muestra.

Uno de los parámetros evaluados en este primer experimento además de probar cada una de las muestras en los genesensores que contenían el total de las sondas manejadas (según la Figura 4E), fue el variar la cantidad de DNA proveniente de los amplificados de cada muestra durante el proceso de hibridación

y cuya finalidad era evaluar posibles cambios en la intensidad de cada una de las señales. La Figura 15 muestra las hibridaciones que resultaron de haber usado 1 μ L del amplificado de cada una de las muestras a analizar, mientras que la Figura 16 muestra las hibridaciones realizadas con 2 μ L de DNA de cada amplificado.

Un segundo experimento consistió en someter las muestras tumorales M1 y M2, ambas por separado, a una serie de hibridaciones donde se corroboró la sensibilidad de las sondas mutantes en la detección de las variantes AAa/c y AAc del HPV 16. Para este experimento se usó el diseño de fijación de las sondas según la Figura 4C y 4D (con sondas sin lavar) depositando en el genesensor solo las sondas mutantes que reconocen la mutación 145 presente en la muestra M1 y la 145 y 183 presentes en la muestra M2 las cuales distinguen a las variantes AAa/c y AAc, respectivamente. Los resultados de estas hibridaciones están representados en la Figura 17, en ella las muestras M1 y M2 registran señal positiva en los sitios esperados lo que respalda de cierta manera la funcionalidad del Biochip de DNA (tipo genesensor), sin embargo, este diseño no pone en evidencia posibles hibridaciones inespecíficas que se pueden dar en el sistema a causa de que el genesensor no contiene alguna otra sonda diferente a las sondas mutantes. Las muestras W1, M3 y M4 que no presentan las mutaciones presentes en las sondas fijadas en el genesensor también se sometieron al mismo proceso de hibridación y solo en el caso de M4 se registraron hibridaciones inespecíficas en el caso de ambas sondas mutantes. Estos resultados también se muestran en la Figura 17 a siete días de re-exposición de la placa radiográfica.

Un tercer experimento consistió en someter la muestra M1 y la M2, ambas por separado, a una serie de hibridaciones donde se evaluó el efecto de la densidad de las sondas modificadas sobre la superficie del genesensor, esto a causa de que se creía que durante la síntesis de las sondas 3'aminopropanol (necesario este último para la fijación covalente de la sonda al portaobjeto), un gran número de grupos aminos quedaban libres, mismos, que de alguna manera podrían estar compitiendo con las sondas por los espacios sobre el área de fijación de la sonda al portaobjeto y esto afectaría, de alguna forma, la intensidad de las señales registradas. Como primer paso lo que se hizo fue elegir las muestras que se iban a someter a estas pruebas: M1 y M2 resultaron seleccionadas por el hecho de conocer la secuencia del fragmento de amplificación lo que las hizo, desde un principio muestras altamente confiables y específicas para los propósitos de esta investigación en general. El siguiente paso era evaluar los posibles excesos de grupos aminos libres en las sondas recién sintetizadas y para ello lo que se hizo fue preparar varias alícuotas de las sondas que se iban a trabajar que en este caso correspondieron a las sondas mutantes mut-AAa/c y mut-AAc.

Estas alícuotas se dividieron en dos grupos, el primer grupo contenía solo la sonda respectiva a una concentración de 20 pmol/ μ L diluida en agua inyectable y a las cuales se les consideró como sondas sin lavar (S/L) depositándose como tal en el portaobjetos. El segundo grupo de sondas con las mismas características que las primeras, fueron sometidos a diversos lavados con agua inyectable en

filtros microcon-3, con la finalidad de eliminar solo los posibles grupos aminos libres presentes en las diluciones ya hechas de cada una de las sondas. A las sondas sometidas a estos lavados en microcon-3 se les denominó sondas lavadas (L) y estas al igual que las anteriores se fijaron a los portaobjetos en patrones previamente determinados. Las sondas mutantes mut-AAa/c y mut AAc lavadas y sin lavar se fijaron sobre áreas predeterminadas en el portaobjetos conforme al diseño del genesensor indicado en las Figura 4A y 4B.

Tanto M1 como M2 se sometieron a hibridación sobre los genesensores con ambos diseños de sondas lavadas y sin lavar, los resultados se muestran en la Figura 18 a diferentes periodos de re-exposición de la placa radiográfica. Ambas muestras registraron señales positivas en los sitios esperados, sin embargo, a primera vista pareciera no haber cambios significativos en la intensidad de la señal entre las sondas mutantes lavadas y sin lavar.

Cabe resaltar que las hibridaciones realizadas con las diferentes muestras manejadas en este trabajo resaltando principalmente a M1 y M2 positivas para las variantes AAa/c y AAc respectivamente dieron señales positivas muy visibles sobre los diferentes diseños del sistema genesensor evaluados.

El cuarto experimento implementado en la detección de las variantes AAa/c y AAc, fue el poner a prueba del mismo modo que se hizo con el sistema genesensor a una marca comercial de microarreglos llamados Creative Chips Microarray. Al igual que el experimento anterior las sondas mutantes lavadas y sin lavar fueron fijadas sobre la superficie del Creative Chips Microarray según la Figura 4A y 4B. Las muestras M1 y M2 se sometieron al proceso de hibridación en los Creative Chips Microarray y las señales sobre ellos fueron registradas a 3, 5 y 14 días de sobreexposición de la placa autoradiográfica. Fueron detectadas señales muy débiles sobre estos microarreglos en comparación con el sistema genesensor implementado por nosotros bajo las mismas condiciones de trabajo y con las mismas muestras. Las hibridaciones realizadas en estos microarreglos se muestran en la Figura 19. En la Figura 20 se comparan las hibridaciones realizadas en el Creative Chips Microarray y en nuestro sistema genesensor a 14 días de sobreexposición de la placa radiográfica.

Señales inespecíficas fueron registradas en la mayoría de la hibridaciones realizadas sobre los genesensores durante la detección de las variantes AAa/c y AAc cuando la placa era sobreexpuesta a periodos prolongados de tiempo. Durante las hibridaciones con muestras positivas para la variante AAa/c como lo es M1, ligeras señales positivas se registraron no solo en el área de la sonda mutante mut-AAa/c que es 100% complementaria al sitio de la sonda dentro del amplificado de M1, sino que también se presentaron en el área de las sondas silvestres diseñadas para esta variante (wt-AAa/c). Lo mismo se registró en el caso de la detección de la variante AAc solo que en el área de las sondas correspondientes. Tanto las hibridaciones específicas como inespecíficas para ambas variantes se aprecian mejor en la Figuras 15 y 16.

Finalmente, un quinto experimento fue implementado con las muestras que registraban señales inespecíficas como M1, M2 y M4, donde se sometieron a hibridación sobre los genesensores diferentes diluciones de cada uno de los amplificadores. Tres diluciones fueron evaluadas: 1:3, 1:9 y 1:27, además, de él amplificado de cada una de las muestras sin diluir. El diseño de las sondas fijadas sobre el genesensor para este experimento fue según la Figura 4E. Los resultados de estas pruebas se reportan a 3 días de exposición de la placa radiográfica, cabe mencionar que a cortos periodos de exposición de la placa algunas señales inespecíficas aún no son muy visibles al menos en el caso de algunas de las muestras trabajadas, sin embargo, en un periodo más prolongado de exposición de las muestras a la placa autoradiográfica se hacen más evidentes este tipo de apareamientos incorrectos. En la Figura 21 se reportan las hibridaciones con las diluciones realizadas para la muestra M1 positiva para AAa/c, en la Figura 22 se muestra la muestra M2 positiva para la variante AAc y finalmente la muestra M4 se reporta en la Figura 23.

Estos resultados representan el total de experimentos realizados para probar el diseño propuesto para el Biochip de DNA (tipo genesensor) en la detección de la variante AAa/c y AAc del HPV 16, sin embargo, un número mayor de muestras deben ser sometidas al proceso de hibridación sobre el genesensor con la finalidad de validar la alta funcionalidad y especificidad del sistema.

La cuantificación de las intensidades de señal obtenidas sobre cada uno de los genesensores enfocados a la detección de las variantes AA a/c y AAc se muestran en la Figura 26A. Mientras que los resultados densitométricos obtenidos de las hibridaciones con sondas lavadas (L) y sin lavar (S) sobre nuestros genesensores y los Creative Chip Microarray se muestran en las figuras 27 y 28 (según los diferentes patrones de fijación de las sondas, Figuras 18,19 y 20).

De acuerdo con el análisis cuantitativo, el sistema genesensor permitió la plena identificación de las variantes virales AAa/c y AAc en muestras de pacientes con cáncer cervical, cuyas intensidades de señal se presentan superiores a las registradas en aquellos sitios donde se aprecian ligeras señales inespecíficas (productos de apareamientos estables entre secuencias no complementarias en su totalidad). Además, se reporta una mayor eficiencia del sistema genesensor con respecto a los Creative Chips Microarray en el reconocimiento específico de secuencias, como se aprecia en las Figuras 27 y 28, donde las intensidades de señal se registraron mayores tanto en sondas lavadas (L), como en sondas sin lavar (S) desde las muestras M1 y M2, mientras que en los Creative Chips Microarray se obtuvieron señales muy débiles de hibridación e incluso hubo aparición de señales inespecíficas (ver Figuras 27A - B y 28A).

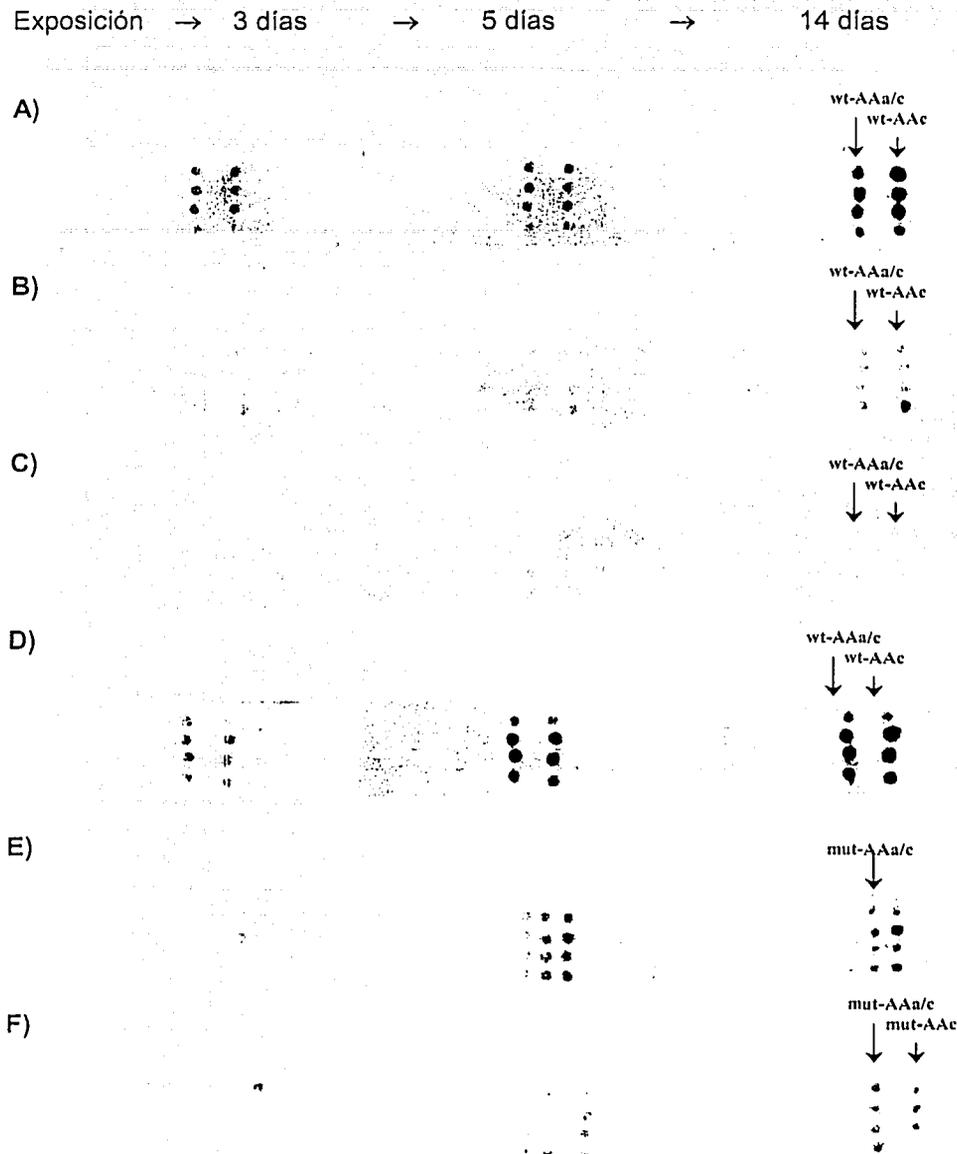


Figura 15. Detección de las variantes AAa/c y AAC del HPV 16 en DNA blanco tumoral proveniente de pacientes con cáncer cervical invasor. (Sondas según la Figura 4E, hibridaciones (con 1 μ L del amplificado de cada muestra) a diferentes periodos de sobreexposición de la placa autoradiográfica)
 Controles positivos para HPV 16 de tipo silvestre *wt-AAa/c: A) W1 (1.4 μ g/ μ L) y B) W2 (200 ng/ μ L),
 Muestras: Secuenciadas E) M1 (*mutAAa/c) y F) M2 (*mutAAc),
 No secuenciadas C) M3 y D) M4 ambas *wtAAa/c.

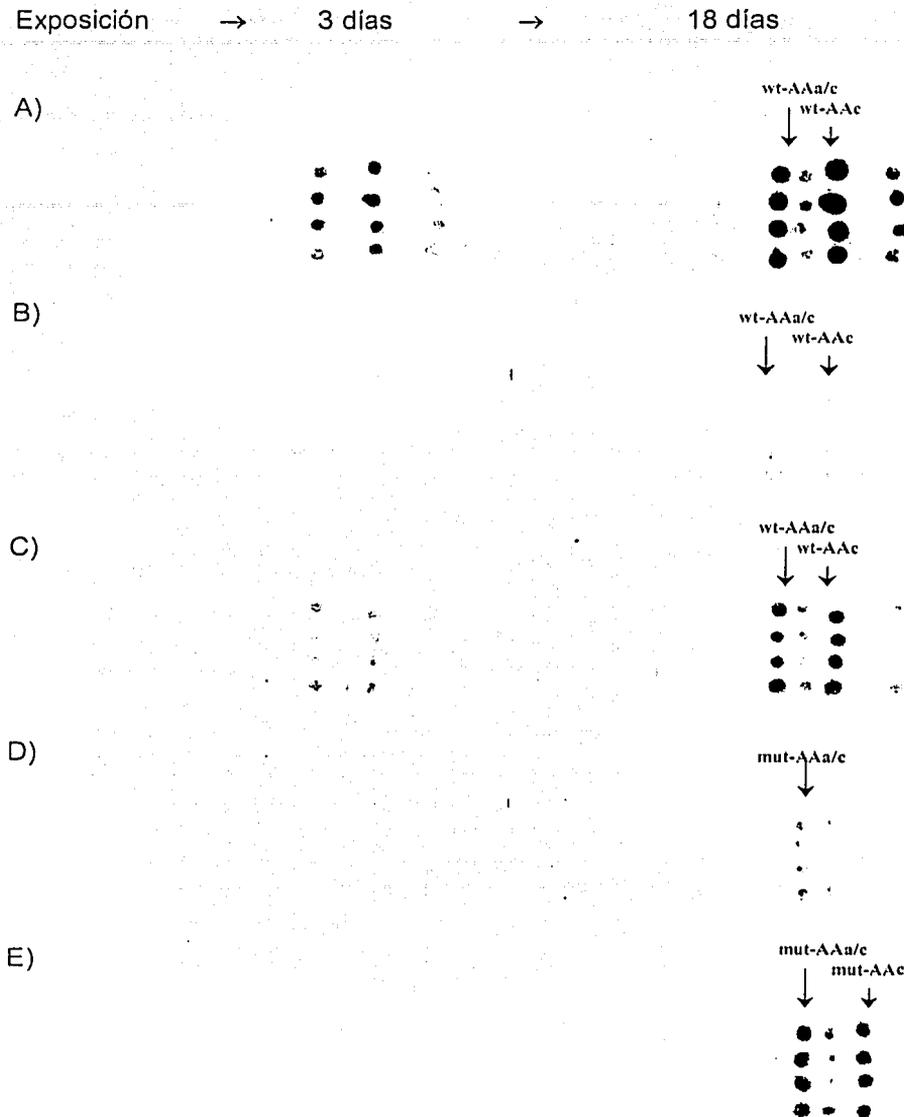


Figura 16. Detección de las variantes AAa/c y AAC del HPV 16 en DNA blanco tumoral proveniente de pacientes con cáncer cervical invasor. (Sondas según la Figura 4E, hibridaciones (con 2 μ L del amplificado de cada muestra) a diferentes periodos de sobreexposición de la placa autoradiográfica)

Control positivo para HPV 16 de tipo silvestre: A) W1 (1.4 μ g/ μ L - *wtAAa/c),

Muestras: Secuenciadas D) M1 (*mutAAa/c) y E) M2 (*mutAAc),

No secuenciadas B) M3 y C) M4 ambas *wtAAa/c.

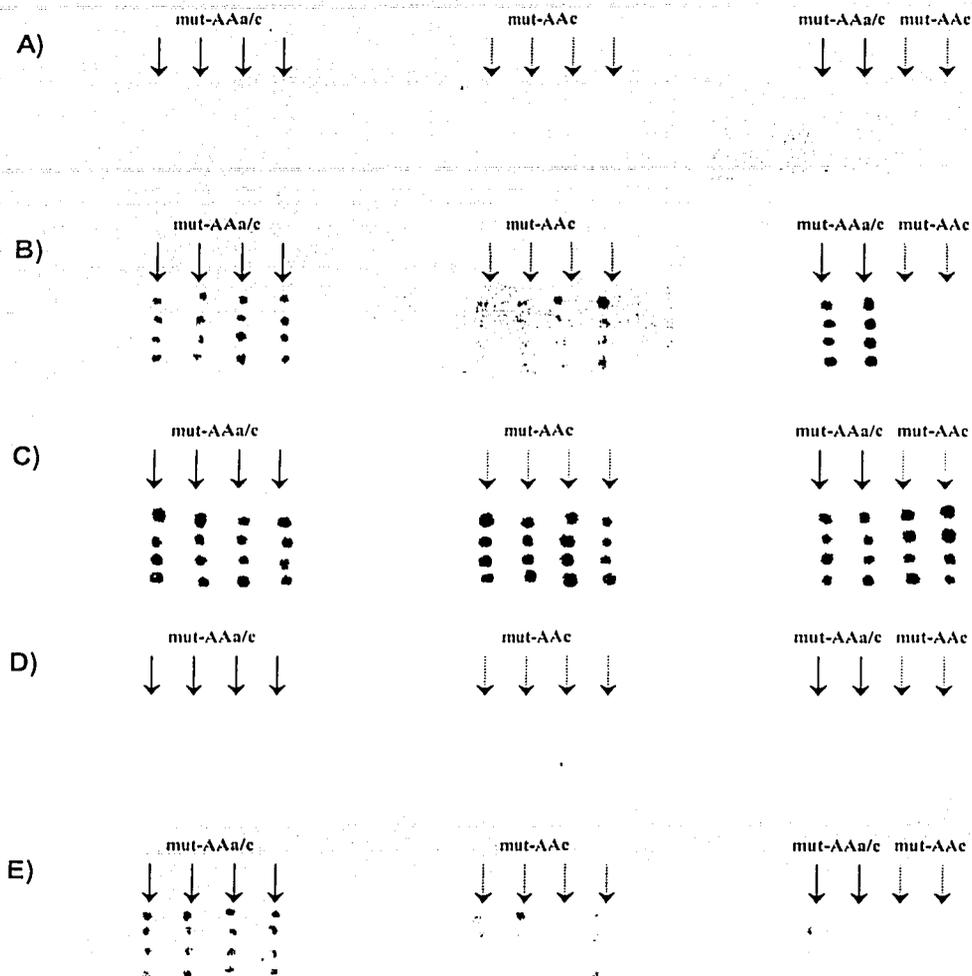


Figura 17. Detección de las variantes AAa/c y AAc del HPV 16 en DNA blanco tumoral sobre genesensores con sondas sin lavar.

(Sondas según la Figura 4C y 4D, hibridaciones a siete días de sobreexposición de la placa autoradiográfica)

Control positivo para HPV 16 de tipo silvestre: A) W1(1.4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ - *wtAAa/c),

Muestras: Secuenciadas B) M1(*mutAAa/c) y C) M2 (*mutAAc),

No secuenciadas D) M3 y E) M4 ambas *wtAAa/c.

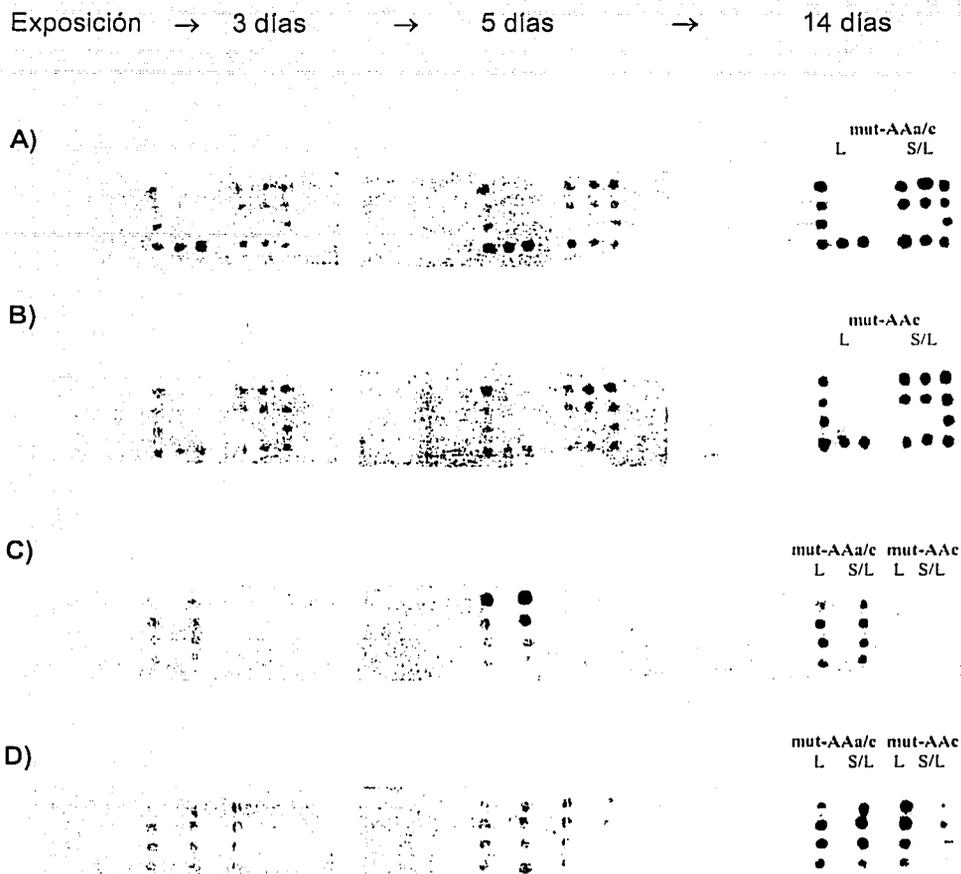


Figura 18. Detección de las variantes AAa/c y AAC del HPV 16 en DNA blanco tumoral sobre los genesensores con sondas lavadas (L) y sin lavar (S/L). (Sondas según la Figura 4A(A y B) y 4B (C y D), hibridaciones a diferentes periodos de sobreexposición de la placa autoradiográfica)
Muestras: Secuenciadas A y C) M1 (°mutAAa/c), B y D) M2 (°mutAAC).

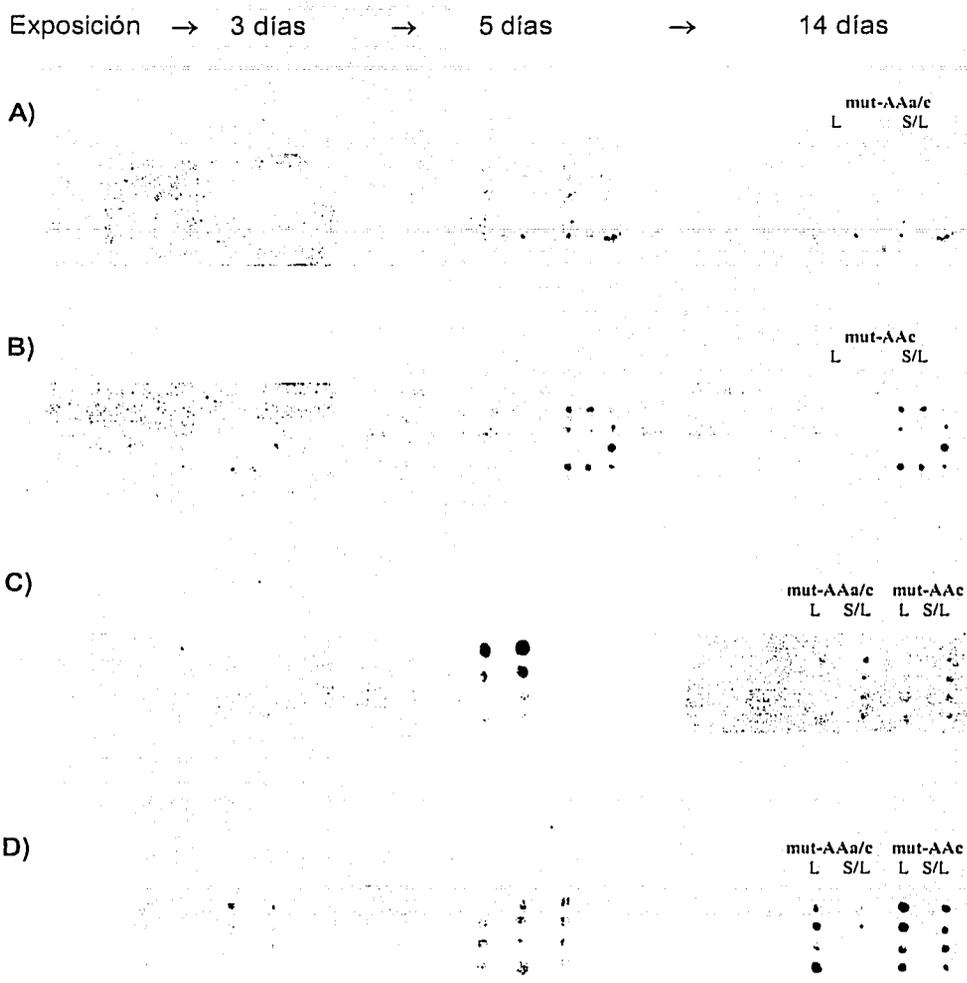


Figura 19. Detección de las variantes AAa/c y AAc del HPV 16 en DNA blanco tumoral sobre los Creative Chips Microarray con sondas lavadas (L) y sin lavar (S/L).
 (Sondas según la Figura 4A(A y B) y 4B (C y D), hibridaciones a diferentes periodos de sobreexposición de la placa autoradiográfica)
 Muestras: Secuenciadas A y C) M1(°mutAAa/c), B y D) M2 (°mutAAc),

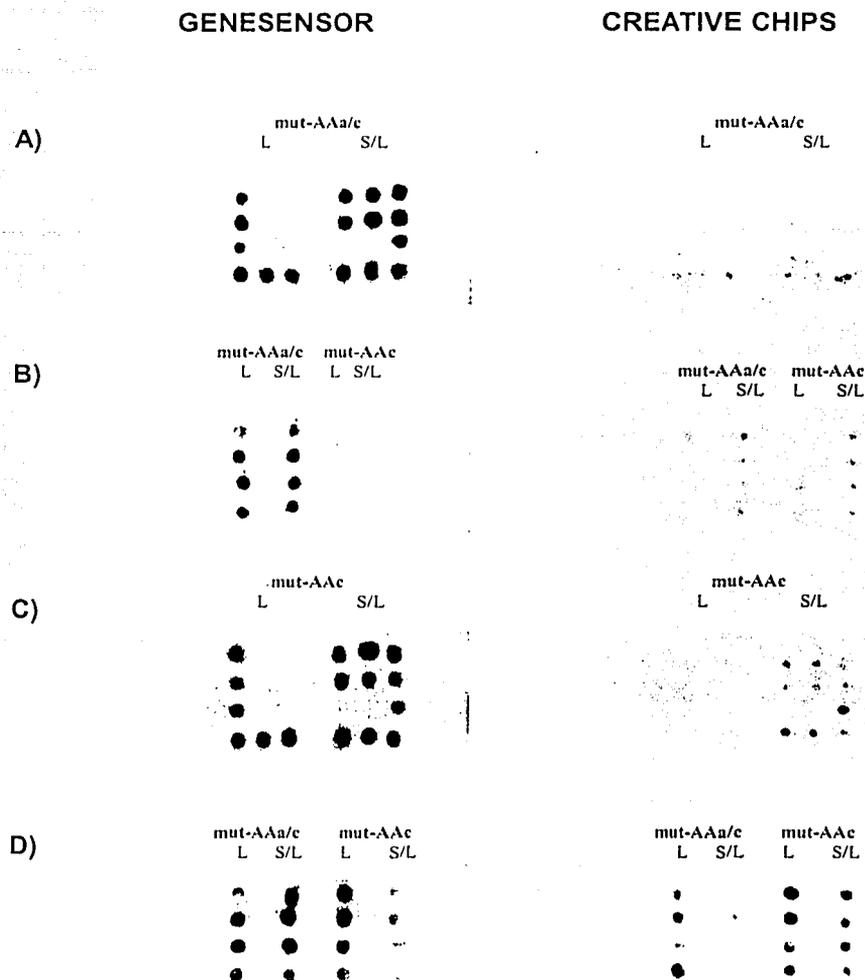


Figura 20. Comparación de las hibridaciones realizadas sobre el sistema genesensor y el Creative Chips Microarray con sondas lavadas (L) y sin lavar (S/L) en DNA blanco tumoral.

(Sondas según la Figura 4A (A y C) y 4B (B y D), hibridaciones a 14 días de sobreexposición de la placa autoradiográfica)
 Muestras: Secuenciadas A y B) M1 (32 mutAAa/c), C y D) M2 (32 mutAAc),

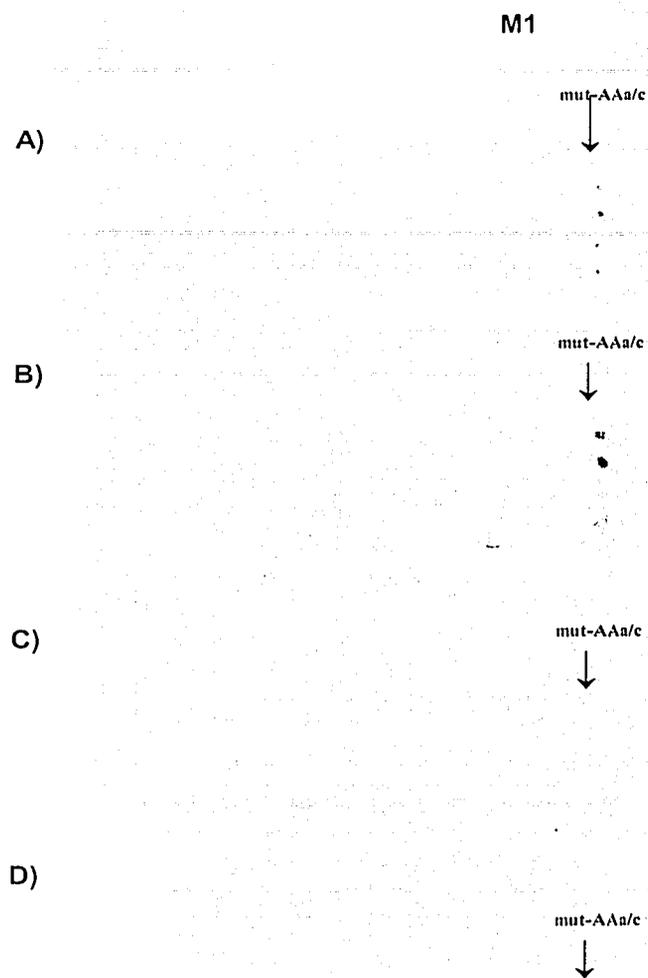


Figura 21. Detección de la variante AAa/c sobre el genesensor en 3 diferentes diluciones del amplificado del DNA blanco tumoral de la muestra M1 ($\gamma\text{mutAAa/c}$).

A) Sin Dilución, B) Dilución 1:3, C) Dilución 1:9, D) Dilución 1:27

(Sondas según la Figura 4E, hibridaciones a 3 días de exposición de la placa autoradiográfica)

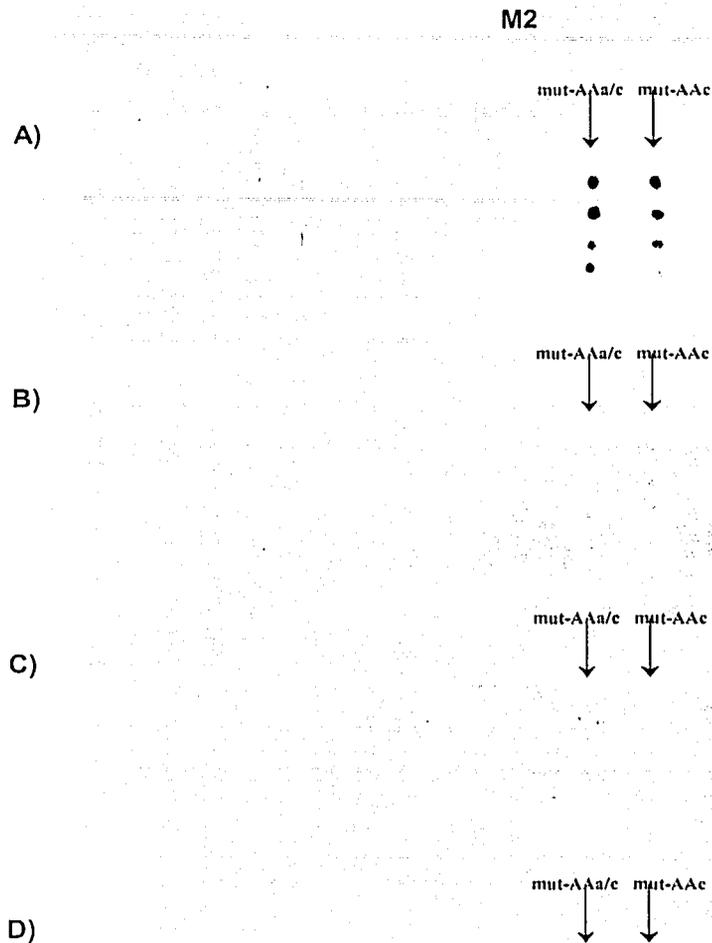


Figura 22. Detección de la variante AAc sobre el genesensor en 3 diferentes diluciones del amplificado del DNA blanco tumoral de la muestra M2 (Δ mutAAc).
 A) Sin Dilución, B) Dilución 1:3, C) Dilución 1:9, D) Dilución 1:27
 (Sondas según la Figura 4E, hibridaciones a 3 días de exposición de la placa autorradiográfica).

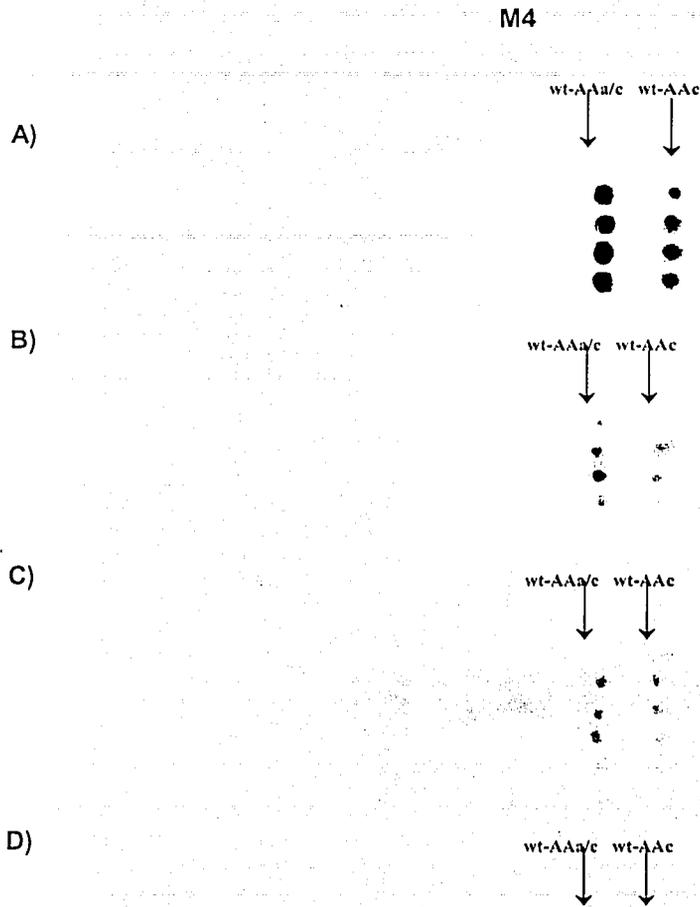


Figura 23. Detección del HPV16 de tipo silvestre sobre el genesensor en 3 diferentes diluciones del amplificado del DNA blanco tumoral de la muestra M4 (*wtAAa/c y *wt-AAc). A) Sin Dilución, B) Dilución 1:3, C) Dilución 1:9, D) Dilución 1:27 (Sondas según la Figura 4E, hibridaciones a 3 días de exposición de la placa autoradiográfica)

6.2.5 Detección de la variante E en el gen E6 de HPV 16 con DNA blanco proveniente de la línea celular Caski.

El diseño del Biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de la variante E del HPV 16 requirió de un análisis más detallado de las secuencias virales a manejar en el genesensor a consecuencia sobre todo del sitio donde se registra la mutación 350. La mutación 350 T→G es quien distingue a la variante EUR40 del HPV 16. El diseño de las sondas fue realizado a partir del gen E6 como hemos mencionado con anterioridad.

Dos muestras fueron usadas en la detección de la variante EUR40-G sobre el sistema genesensor; W1 y Caski. La primera W1, fue considerada como control positivo por provenir de DNA de HPV 16 clonado con la secuencia de origen silvestre y la segunda Caski, se uso debido a que esta línea celular presenta un número estimado que va de 60-600 copias del DNA viral, además de presentar la mutación 350 que distingue a la variante EUR40.

Como un primer paso en la detección de esta variante un primer par de iniciadores previamente reportados (A2) fueron utilizados con la finalidad de amplificar un fragmento del gen E6 cuya secuencia abarca al nucleótido 350, sin embargo, diversas dificultades surgieron al tratar de obtener el producto de PCR desde las muestras W1 y Caski. Diferentes parámetros fueron modificados durante los procesos de amplificación de las muestras entre los que destacan la temperatura de alineamiento de los iniciadores y la concentración de Mg⁺. Después de un gran número de intentos, se obtuvo el amplificado esperado desde W1 y Caski a una temperatura de alineamiento de los iniciadores de 43 °C y a una concentración final de Mg⁺ de 2.5 mM. Tanto el amplificado de W1, como el de Caski fue prealineado a los oligonucleótidos estabilizadores marcados con $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP denominados 2I-EUR y 2D-EUR antes de someterse al proceso de hibridación sobre los genesensores.

Un par de sondas fueron diseñadas para detectar la mutación 350 desde el amplificado de PCR, la primera sonda wtE60-T distingue a la secuencia silvestre, mientras que la segunda mutE40-G detecta a la variante en cuestión. Estas sondas al igual que las otras fueron fijadas sobre la superficie del genesensor de acuerdo con la Figura 4E. Cada uno de los genesensores usados en la detección de la variante E contenían sondas sin lavar.

Los resultados de las hibridaciones de los amplificados (A2) desde W1 y Caski bajo diferentes condiciones de PCR se muestran en la Figura 24. Cada una de las hibridaciones resultantes desde estas muestras dieron señal positiva en los sitios esperados con una re-exposición de las muestras de 3 y 14 días, al parecer sin la presencia de alineamientos inespecíficos lo que resulto en una alta especificidad del genesensor en la detección de la variante EUR40-G.

Dada la dificultad del primer intento por amplificar un fragmento del gen E6 desde el par de iniciadores reportados (A2), se diseñó un nuevo par de iniciadores denominados A3 los cuales hicieron posible la amplificación del fragmento del gen E6 de interés de manera más específica. El producto de amplificación desde los iniciadores A3 resultó ser la mitad del tamaño del producto producido por A2, es decir, un fragmento muy corto (77 pb) cuya secuencia comprende al nucleótido 350, la cual permite la plena identificación de la variante EUR40-G. Los amplificadores desde A3, en comparación con los de A2, fueron obtenidos muy fácilmente a una temperatura de alineamiento de 43 °C y a una concentración de Mg⁺ de 2.5 mM.

Al igual que con A2, el producto de amplificación obtenido desde A3 tanto de la muestra W1 como de Caski, fue prealineado a los estabilizadores $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ 2I-EUR y 2D-EUR antes de ser sometidos al proceso de hibridación sobre los genesensores. Las sondas fijadas en el genesensor fueron las mismas que empleamos en el experimento anterior (wtE60-T y mutE40-G). Estas sondas al igual que las otras fueron fijadas sobre la superficie del genesensor de acuerdo con la Figura 4E. Los resultados obtenidos desde este diseño se muestran en la Figura 25 con señales de hibridaciones positivas en los sitios esperados y al parecer sin señales de alineamientos inespecíficos.

El análisis densitométrico de cada una de las señales obtenidas sobre los genesensores en los amplificadores provenientes de A2 y A3 se muestran en la Figura 26 (B). En el caso de A2 se muestran las diferencias obtenidas en las intensidades de señal, desde hibridaciones realizadas con los amplificadores de Caski bajo diferentes temperaturas de alineamiento de los iniciadores y modificando la concentración de Mg⁺ (análisis realizado sobre las imágenes expuestas en la Figura 24). En el caso de A3 solo se muestran las densidades obtenidas usando los amplificadores de Caski a una temperatura de alineamiento de los iniciadores de 43 °C con una concentración de 2.5 mM de Mg⁺ (de acuerdo con las imágenes de la Figura 25).

De acuerdo con el análisis densitométrico, en el caso de la variante E, las señales más intensas se registraron en el amplificador de Caski proveniente del alineamiento de los iniciadores A2 a 43 °C, con 2.5 mM de Mg⁺, seguida del amplificador a 45 °C con 1.5 mM de Mg⁺. Resultados similares se registraron en el caso de los amplificadores provenientes de A3 a 43 °C con 2.5 mM de Mg⁺. En general, las intensidades de señal se registran altas en ambos casos aún después de haber eliminado el ruido de fondo y no se registró señal alguna de apareamientos inespecíficos con alguna otra de las sondas depositadas sobre el genesensor (ver Figura 26).

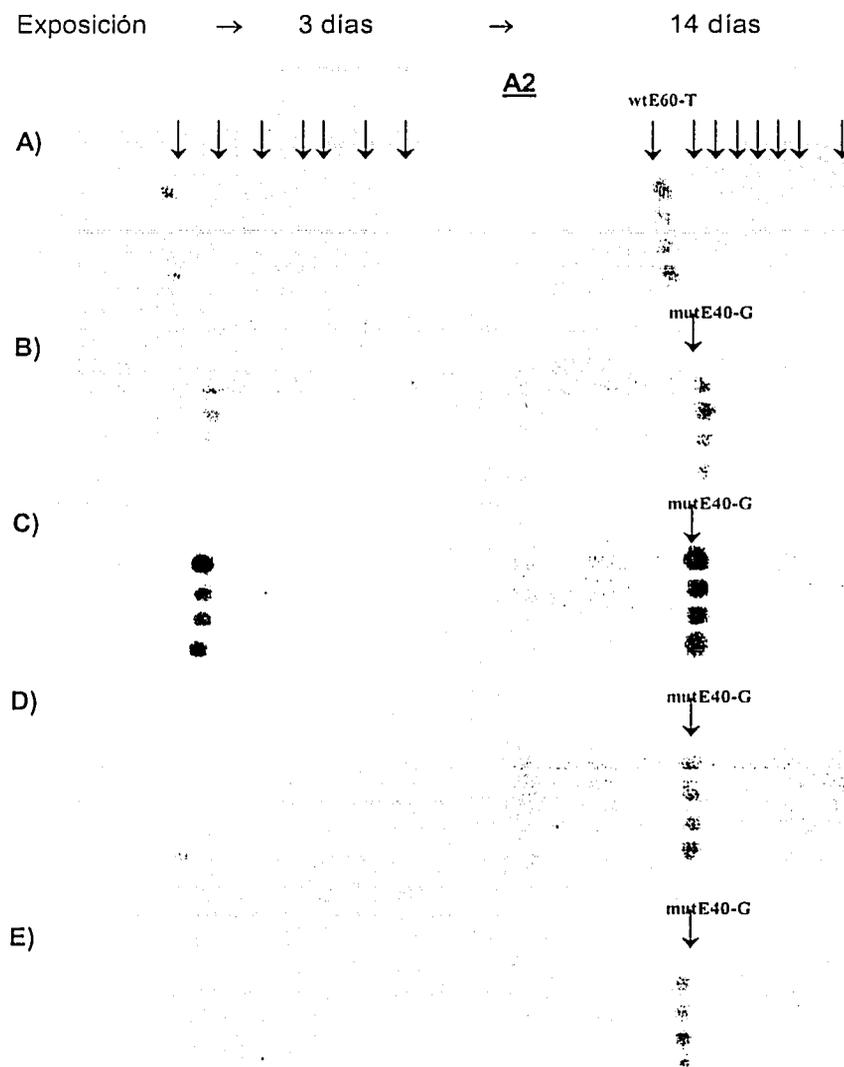


Figura 24. Detección de las variantes E del HPV 16 en DNA blanco tumoral proveniente de la línea celular Caski. (Sondas según la Figura 4E, iniciadores A2, hibridaciones a 3 y 14 días de sobreexposición de la placa autoradiográfica)
 Control positivo para HPV 16 de tipo silvestre *wtEUR60: A) W1 (1.4 µg/µL)
 Muestras: Todas procedentes de Caski a diferentes temp° de alineamiento y Mg+ →
 B) 43 °C-1.5 mM Mg+, C) 43 °C-2.5 mM Mg+, D) 43 °C-2.5 Mg+, E) 45 °C-1.5 mM Mg+

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

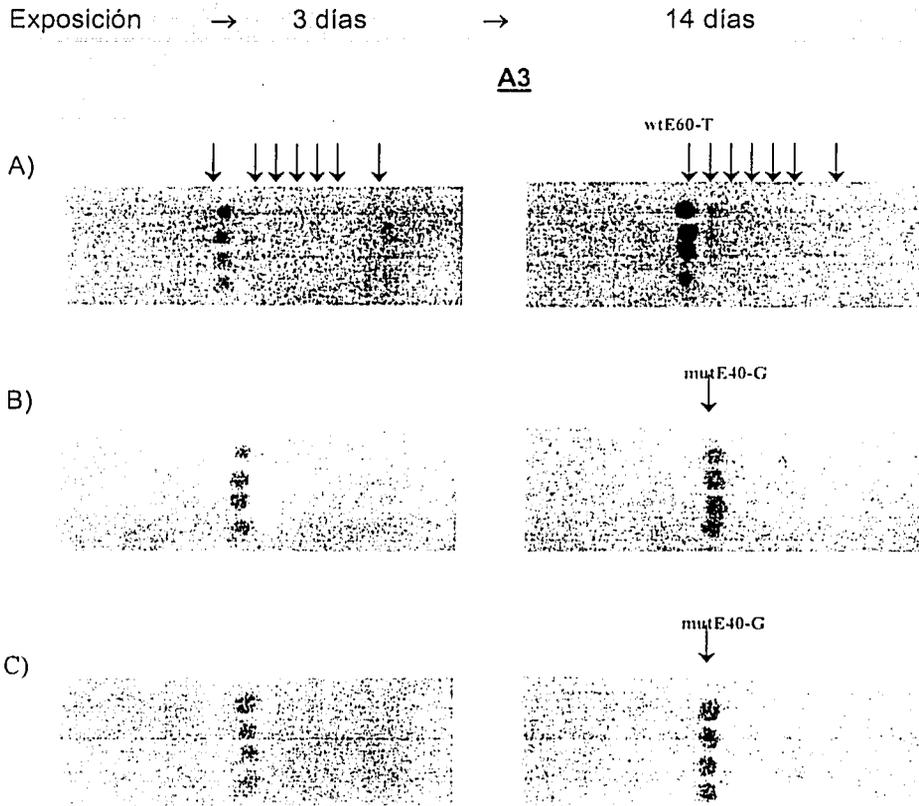
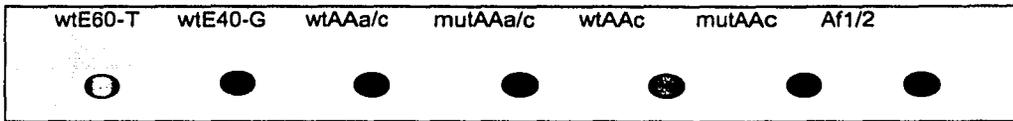
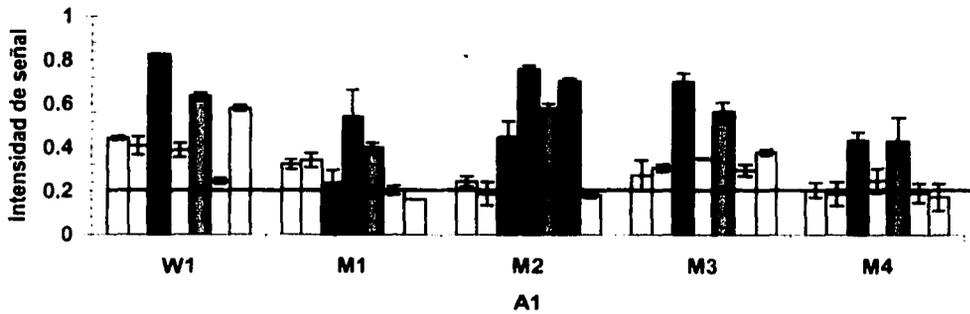


Figura 25. Detección de las variantes E del HPV 16 en DNA blanco tumoral proveniente de la línea celular Caski. (Sondas según la Figura 4E, iniciadores A3, hibridaciones a 3 y 14 días de sobreexposición de la placa autoradiográfica)
 Control positivo para HPV 16 de tipo silvestre *wtEUR60: A) W1 (1.4 µg/µL)
Muestras: B y C) procedentes de Caski a una temperatura de alineamiento de 43 °C y a una concentración de Mg⁺ de 2.5 mM



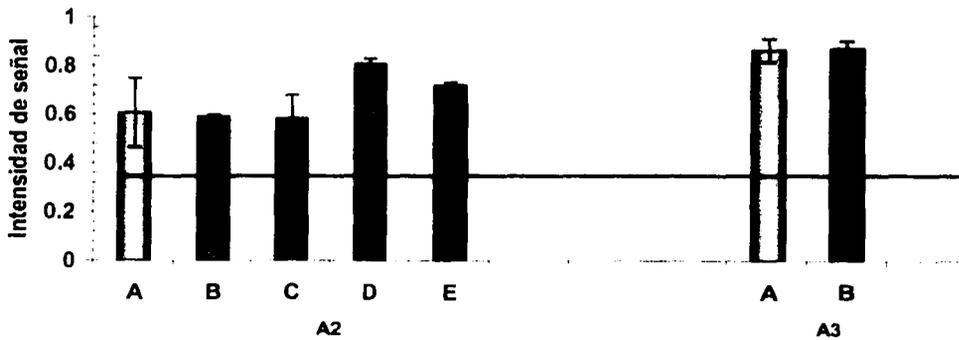
A)

Variante AA



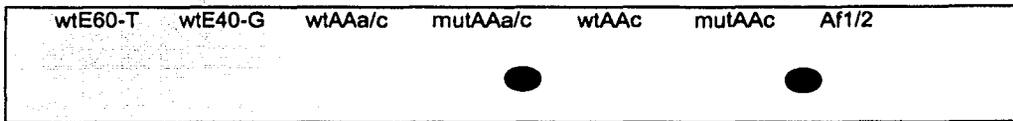
B)

Variante E

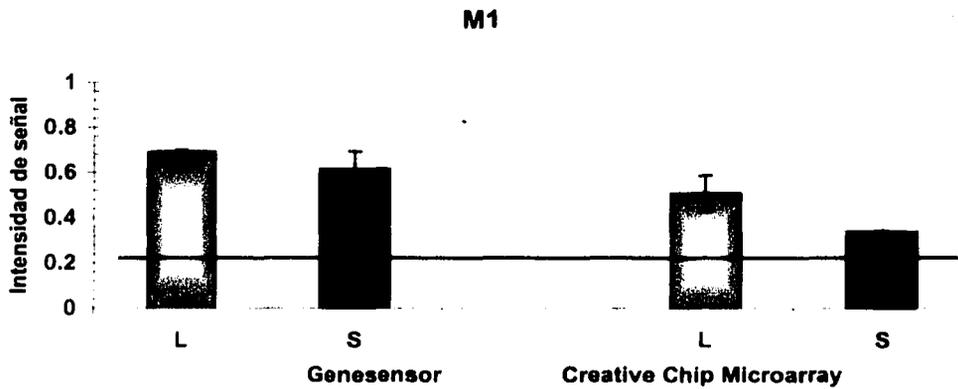


wtE60-T: A mutE40-G: B (43 C/1.5 mM Mg), C (43 C/2.5 mM Mg),
 D (43 C/2.5 mM Mg), E (45 C/1.5 mM Mg).

Figura 26. Análisis cuantitativo de los biochips de DNA (tipo genesensor):
 A) variante AA (según Figuras 15 y 16) y B) variante E (según Figuras 24 y 25) del HPV 16.



A)



B)

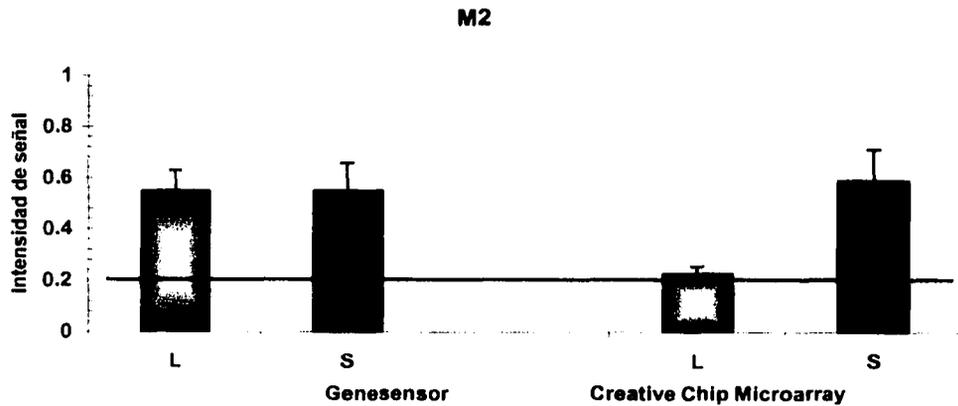
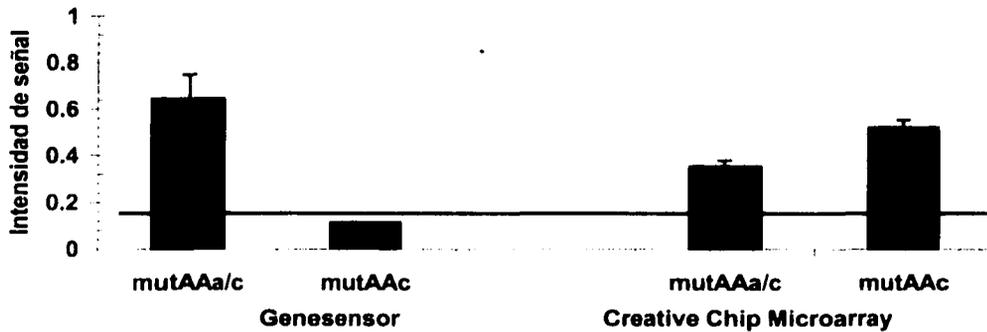


Figura 27. Análisis cuantitativo del genesensor vs creative chip microarray en las muestras M1 (A) y M2 (B) con sondas lavadas (L) y sin lavar (S).

wtE60-T	wtE40-G	wtAAa/c	mutAAa/c	wtAAc	mutAAc	Af1/2
			●		●	

A)

M1



B)

M2

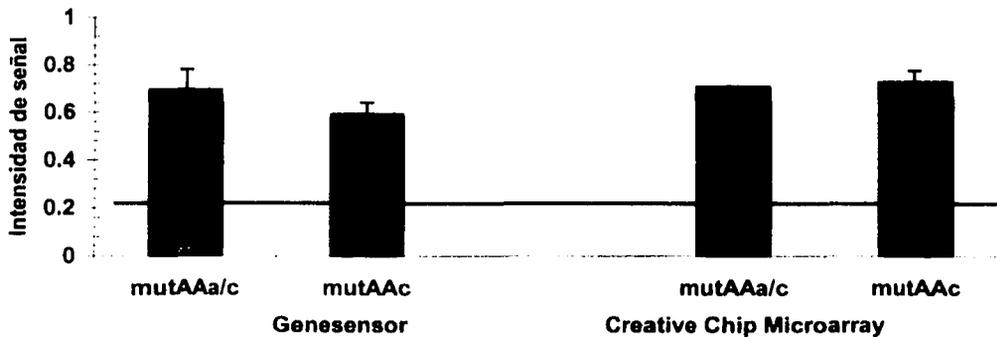


Figura 28. Análisis cuantitativo del genesensor vs creative chip microarray en las muestras M1 variante AAa/c (A) y M2 variante AAc (B).

DISCUSION

7.1 Aspectos generales.

Los avances en la investigación biomédica de las enfermedades oncológicas, particularmente enfocados al estudio y entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la transformación celular, están permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico y tratamiento más eficaces (Hidalgo, et al., 2001). Los biochips de DNA representan una de estas novedosas herramientas enfocadas al análisis específico de secuencias genéticas normales y mutadas. Algunas modificaciones aplicadas a los Biochips de DNA han dado origen al sistema genesensor de doble hibridación contigua que conlleva el uso de estabilizadores prealineados a un DNA blanco de interés, los cuales además de proporcionar mayor estabilidad al sistema durante el proceso de hibridación, permiten hacer más específico el alineamiento de secuencias complementarias lo que favorece el reconocimiento de alteraciones en sitios específicos del genoma (mutaciones puntuales) (Maldonado-Rodríguez, et. al., 199b, Beattie, et. al., 2001 y Maldonado-Rodríguez, et. al., 2002).

Los biochips de oligonucleótidos son muy versátiles en cuanto a sus aplicaciones ya que además de monitorear patrones de expresión, sirven para genotipificar y detectar polimorfismos, tanto en humanos como en agentes patógenos o para secuenciar y detectar mutaciones de importancia clínica (Hidalgo, et al., 2001). En este trabajo aplicamos la tecnología del genesensor a la detección de mutaciones puntuales en sitios específicos del genoma del virus de papiloma humano tipo 16 con la finalidad de diferenciar las variantes virales AA y E, involucradas en la progresión hasta ICC, buscando con ello un nuevo método de diagnóstico molecular preclínico de alta especificidad y bajo costo.

La tecnología del sistema genesensor por hibridación en tandem aplicada a la detección de mutaciones puntuales específicas del gen E6 del HPV tipo 16, facilitó la detección de las variantes virales AA y E, tanto con DNA sintético simulando la secuencia viral, como con DNA tumoral proveniente de muestras de pacientes con ICC y la línea celular Caski. La utilidad del genesensor como un dispositivo para el análisis simultáneo de mutaciones puntuales contenidas en diversas secuencias de DNA sintético en una sola reacción de hibridación, ya ha sido probada con anterioridad con resultados satisfactorios (Loyola, P. A., 1998: Barrera, et. al., 2003).

El diseño aplicado a la detección de cada una de las variantes virales involucró el uso de pequeñas secuencias de DNA blanco sintético y del amplificado del DNA tumoral de cadena sencilla que contenían cambios registrados en sitios específicos del gen E6 del HPV 16, los cuales hacen posible diferenciar las variantes AA y E del resto de las variantes reportadas para este tipo viral (NA, As, y Af) e incluso de otros tipos virales (Yamada, et al., 1997: Wheeler, et al., 1997).

Otros oligonucleótidos llamados estabilizadores fueron requeridos para favorecer la detección específica de las variantes AA y E durante la reacción de hibridación sobre el genesensor. Finalmente, el diseño de diversas sondas que detectarían las secuencias virales de interés dentro del DNA blanco viral pre-alineado a los estabilizadores marcados, constituyeron nuestro sistema genesensor.

Los estabilizadores, pequeños oligonucleótidos de DNA sintético de cadena sencilla (19-21 ntd) cuya secuencia fue complementaria a ambos extremos del DNA blanco (sintético y tumoral) durante los procesos de hibridación, tienen como objetivo primario el exponer el sitio de reconocimiento por las sondas, además de evitar la formación de estructuras secundarias que espontáneamente forma el DNA de cadena sencilla durante los procesos de hibridación, las cuales pueden interferir directamente con el reconocimiento de secuencias intermedias de interés que pueden quedar ocultas, fuera del alcance de sus respectivas sondas complementarias.

Ya en 1991 se había propuesto la fragmentación del DNA antes de los procesos de hibridación para evitar la formación de estructuras secundarias, proceso que se aplicó exitosamente durante la secuenciación de DNA y la detección de mutaciones puntuales. Sin embargo, no fue hasta 1998 donde nuestro grupo pensó en alinear varios oligonucleótidos sintéticos con el DNA blanco para impedir la formación de estructuras secundarias. Estos oligonucleótidos denominados "oligonucleótidos estabilizadores" se acomodaron a lo largo del DNA blanco de tal manera que dejaran libre espacios de cadena sencilla en los que ocurriría el alineamiento de las sondas durante la reacción de hibridación. El sistema se probó con un fragmento del gen de la fibrosis quística, incrementándose la reacción de hibridación y aún mas, cuando la sonda se alineaba contigua al oligonucleótido estabilizador (Loyola, 1998).

Otras propuestas surgieron a la par para evitar la formación de estructuras secundarias. Se reportaba que era posible la sustitución de oligonucleótidos de 18 nucleótidos para reacciones de secuenciación de DNA por el alineamiento en tandem de tres oligonucleótidos iniciadores de 6 ntd cada uno, o uno de 8 ntd y dos de 5 ntd. Este proceso también fue denominado hibridación por posicionamiento contiguo, del inglés "contiguous stacking hybridization" denominando a los estabilizadores como "oligonucleótidos auxiliares" (Loyola, 1998). Aunque algunos problemas han resultado del manejo de estas tecnologías durante las reacciones de hibridación (aumento en la posibilidad de reacciones de unión entre las secuencias interrogadas y las sondas), se ha facilitado la detección de secuencias específicas.

Los estabilizadores manejados por nosotros tuvieron otra característica ya aplicada con anterioridad por nuestro grupo y es que representaron el medio a través del cuál nos fue posible detectar los alineamientos entre DNA blanco de interés y las sonda respectiva después de la reacción de hibridación sobre el genesensor. Lo anterior fue posible debido al marcaje con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ de cada uno de los estabilizadores manejados, previo al alineamiento con su respectivo DNA.

blanco. Resultados previos indican que el marcaje con $\gamma^{32}\text{P-ATP}$ no afecta la reacción de hibridación, incluso se pueden favorecer las señales de hibridación cuando se marcan ambos estabilizadores (Loyola, 1998; Barrera, et al., 2003).

Algunas de las estrategias enfocadas a la detección de mutaciones puntuales en secuencias específicas mediante el sistema genesensor fue el uso de secuencias cortas del DNA blanco tanto sintético como del amplificado desde DNA tumoral, cuya longitud disminuiría la posibilidad de formar estructuras secundarias intercadena dejando libre el área de detección de las sondas respectivas, además de incrementar la especificidad de las hibridaciones realizadas. Otra de las estrategias aplicadas a nuestro sistema fue el proponer que los estabilizadores se alinearan contiguamente a ambos lados del área de las sondas, lo que permitiría que al menos en esa parte de la secuencia se evitara la formación de estructuras secundarias, favoreciendo el reconocimiento y alineación de las sondas complementarias e incrementando la reacción de hibridación de las mismas.

Para optimizar la búsqueda de secuencias específicas se diseñaron sondas de entre 9 y 10 ntd cuyas secuencias representaron fragmentos complementarios del DNA blanco viral de interés pre-fijadas en sitios específicos de portaobjetos convencionales que representaron los genesensores sobre los cuales se llevarían a cabo las reacciones de hibridación. Estas sondas de origen sintético contenían en su secuencia los cambios de bases o mutaciones puntuales que distinguen a las variantes virales AA y E del HPV 16.

La longitud de las sondas de captura fue establecido de acuerdo con investigaciones previas donde ya había sido evaluado el tamaño óptimo de las sondas de captura durante los procesos de hibridación. Los resultados obtenidos por Loyola, 1998 al evaluar diversas sondas de captura de entre 5 y 9 ntd sugieren que las señales de hibridación se incrementan con el tamaño de la sonda, variando desde indetectable en las sondas de 5 y 6 ntd de longitud, con buena detección en sondas de 7 y 8 ntd de longitud hasta señales intensas en los sitios de las sondas de 9 ntd de longitud a una temperatura de 25 °C.

Un factor importante en la detección de las variantes AA y E, fueron las condiciones en que se llevaron a cabo las reacciones de hibridación. Una de ellas fue la temperatura, nosotros realizamos todas las reacciones de hibridación a 25 °C, temperatura que se ha reportado como la más adecuada durante las reacciones de hibridación permitiendo la buena discriminación entre secuencias silvestres y mutantes. Un dato interesante es que a esta temperatura de hibridación puede establecerse un efecto cooperativo entre el estabilizador y la sonda lo que podría conferir estabilidad de hibridación a la sonda y formar un duplex perfecto con su secuencia complementaria en el DNA blanco (Loyola, 1998).

7.2 Análisis del diseño de detección de las variantes AA y E.

El diseño de detección de las variantes AA y E del HPV 16 a través del gen E6 fue sugerido de acuerdo con lo reportado en investigaciones previas sobre diversas variaciones en la secuencia del HPV 16 desde el gen E6 y L1. Ambos genes registran un gran número de mutaciones en su secuencia lo que permitió con la ayuda de análisis filogenéticos, clasificar y diferenciar nuevas y conocidas variantes virales del HPV 16. Una de las ventajas del gen E6 sobre L1, es que E6 es un gen pequeño de aproximadamente 600 pb cuya secuencia altamente variable permite identificar las 5 variantes reportadas para este tipo viral (Yamada, et al., 1997; Wheeler, et al., 1997). Otra de las características que presenta E6 es que se logra su amplificación de manera relativamente sencilla desde el genoma del HPV 16 (Bohm, et al., 1993; Emeny, et al., 1999; Yamada, et al., 1997; Wheeler, et al., 1997) lo que favoreció la idea de usarlo como medio para distinguir las variantes AA y E.

En primera instancia el diseño de detección de las variantes virales se efectuó con DNA sintético cuyo diseño comprendió la secuencia previamente reportada del HPV (tipo silvestre) tomada como control positivo, al carecer de las mutaciones presentes en el gen E6 que distinguen actualmente a las variantes AA y E del HPV 16. Posteriormente el mismo diseño fue aplicado pero ahora para muestras provenientes de DNA tumoral positivas para HPV 16.

Como punto de partida en la detección de las variantes virales se determinó cual de las mutaciones presentes en el gen E6 distinguían únicamente a la variante AA y a la E encontrándose que la mutación 145 está presente en aquellas muestras cuya secuencia coincide con la variante AA, sin embargo, como esta mutación se presenta en dos de las subvariantes reportadas para ella (subvariante tipo a y subvariante tipo c) el diseño podría caer en la ambigüedad de reconocer la variante de interés, pero no de manera específica. Para resolver esto, buscamos otra mutación específica en el gen E6 que pudiera presentar solo una de las subvariantes y lo que encontramos es que una mutación en el nucleótido 183 del gen E6 esta presente solo en la variante AA subvariante c, lo que hacía más específico el sistema. Es por ello que el diseño comprende tanto la detección de la variante AA (AAa/c), como el de su subvariante del tipo c (AAc).

Un aspecto importante que hay que resaltar de este tipo de diseño para la detección de la variante AA es que al menos para el caso de México la variante AA resulta ser la más frecuente a diferencia de otros países donde la variante E suele ser la más común. Diversos estudios revelan que incluso la variante AA puede llegar a ser más oncogénica que otras variantes, como es el caso de la subvariante c, la cual además se reporta más frecuentemente dentro del total de los casos analizados en la población mexicana (Berumen, et. al., 2001; Casas, et. al., 1999).

El diseño de detección de la variante AAa/c dentro del DNA blanco sintético lo representaron dos fragmento de 48 ntd, un fragmento con la secuencia silvestre y otro con la secuencia mutante (*wt- AAa/c y °mut-AAa/c), ambos contienen en la parte central el nucleótidos 145 de interés para nosotros, dichas secuencias que abarcan los nucleótidos 121-168 contienen en promedio igual número de G-C y T-A (ver Figura 6). Es importante mencionar esto, por que de acuerdo con el contenido de cada una de las bases en la secuencia de interés puede haber un mejor apareamiento de las secuencias complementarias y con ello la funcionalidad del Biochip de DNA (tipo genesensor) se puede ver incrementada. Dentro del DNA blanco para el caso de la variante AAa/c en el área de la mutación 145, sitio a partir del cual se diseño la sonda de detección de esta variante (mutAAa/c), hay abundancia de T-A (ver Figura 6), por lo tanto la sonda de detección es rica en este par de bases, sin embargo, aun así fue posible la detección de esta variante viral como vemos en la Figura 13.

El buen apareamiento de la sonda mutAAa/c al DNA blanco sintético (°mutAAa/c) cuya secuencia era totalmente complementaria en parte pudo verse favorecido por el uso de los estabilizadores 1I-AAa/c y 1C-AAa/c como ya mencionamos anteriormente, pues además de proporcionar estabilidad al DNA blanco e impedir la formación de estructuras secundarias, el contenido específico de bases como G-C en sitios específicos de la secuencia pueden jugar un papel importante en la unión de la sonda con su secuencia complementaria y facilitar de esta manera los procesos de hibridación y detección de secuencias específicas. Este efecto ya ha sido reportado con anterioridad por Loyola 1998 quien menciona que la secuencia de los estabilizadores, sobre todo las bases vecinas al punto de contigüidad con la sonda pueden o no favorecer la estabilidad del híbrido, afectando la fuerza de hibridación y también la sensibilidad de la detección.

La detección de la variante AAC desde DNA blanco sintético comprendió una secuencia cuya composición en G-C era bajo con respecto al par A-T, lo mismo sucedió con las sondas manejadas (ver Figura 8) y aunque esto puede alterar el alineamiento de las secuencias durante los procesos de hibridación y registrar por ello bajas señales, otros parámetros como la temperatura de hibridación, el pH de las soluciones, el tiempo de hibridación y la vida media de la marca radiactiva pudieron en gran medida favorecer la detección de secuencias, pues como veremos más adelante la detección de estas variantes fue posible, registrándose incluso muy buenas señales de hibridación tanto con DNA sintético (ver Figuras 13 y14) como con DNA tumoral (Figuras 15 a 23). Este diseño se acopló de igual manera que con la variante AAa/c, al amplificado del DNA tumoral A1, utilizando los estabilizadores correspondientes (1C-AAa/c y 1D-AAC)

Una de las ventajas del diseño efectuado para las variantes AAa/c y AAC, es que se puede favorecer la detección de una sola de las variantes o bien de ambas en una misma reacción de hibridación y una de las estrategias para lograr esto es mediante el uso de los estabilizadores adecuados (ver Figura 17).

Las sondas de detección de la variante AAc requirieron el diseño de secuencias de una longitud mayor a la de las otras variantes. Un total de 10 nucleótidos comprendieron las sondas wt-AAc y mut-AAc, el por que de esta longitud se debió a que una sonda de 9 ntd hubiera estado compuesta solo de bases A-T, lo que quizá debilitaría el alineamiento de las sondas a su secuencia complementaria en el DNA blanco, por lo que se opto por agregar una base más (que en este caso fue un C) la cual incrementaría la estabilidad del alineado facilitando la detección de la variante viral.

Interesantemente el diseño para la detección de la variante E desde el gen E6 del HPV a pesar de haber sido efectuado desde otro fragmento del mismo gen y cuyo cambio en el nucleótido 350 permite diferenciar la variante E40-G de la E60-T considerada de tipo silvestre, es un fragmento rico en bases A-T, sin embargo, al igual que con las otras variantes se logró la detección de la variante viral de manera exitosa tanto con DNA blanco sintético (ver Figuras 13 y 14) como del DNA proveniente de Caski (ver Figura 24 y 25).

En general, de acuerdo con el análisis de la secuencia del gen E6 desde cada uno de los diseños manejados en la detección de las variantes virales, podemos concluir que a pesar de ser un gen rico en A-T y de que el diseño de cada una de las variantes se basó en secuencias ricas en este par de bases, se logró la detección específica de cada una de las variantes propuestas, lo que demuestra la versatilidad del sistema genesensor al favorecer la detección de secuencias específicas mediante el alineamiento con sus secuencias complementarias en una sola reacción de hibridación. Además, hay que mencionar lo económico del sistema al requerir el uso de oligonucleótidos de secuencias cortas para realizar la detección de las variantes virales de manera específica.

7.3 Análisis de las imágenes de detección de las variantes AA y E en el Biochip de DNA (tipo genesensor).

Un primer ensayo en la validación del diseño de detección de las variantes virales AA y E fue el probar el sistema genesensor en DNA de origen sintético con la finalidad de establecer las condiciones optimas en que serian realizadas las pruebas con DNA tumoral.

Lo reportado a continuación involucró únicamente el diseño y detección de la variante AAa/c y AAc.

En la Figura 13 se muestran las hibridaciones obtenidas del alineamiento del DNA blanco sintético mutante genesensores que contenían únicamente las sondas mutantes complementaria en su totalidad a estas secuencias; en A) variante EUR-40, en B) variante AAa/c y en C) variante AAc. Cada genesensor contiene un total de 8 repeticiones donde el promedio de hibridaciones realizadas

por sitio es similar en cada una de las variantes. Sin embargo, se registraron señales de hibridación más intensas que otras al manejar DNA blanco sintético, como por ejemplo la variante AAC que registro señales de hibridación más intensas con respecto a la variante AAa/c y esta a su vez de la variante E. Esta variación en los patrones de hibridación entre una variante y otra, pueden ser el resultado de la fuerza de alineamiento entre la secuencia del DNA blanco y la secuencia de la sonda de captura. Lo anterior se deduce al analizar las secuencias manejadas en cada uno de los diseños de detección de variantes, la variante AAC cuyas señales de hibridación son más intensas presenta en el punto de mutación (ntd 183) el par G-C cuya fuerza de unión es muy estable, con respecto al par A-T presente en la variante AAa/c. En lo que respecta a la variante E el patrón de hibridación del DNA blanco sintético fue muy bajo a pesar de contener en el área de la sonda un mayor número de bases G-C a diferencia de las variantes AAa/c y AAC, sin embargo, lo anterior pudo ser causado por un mal manejo de las concentraciones de las sondas de captura o del DNA blanco sintético, o bien a que no manejamos las condiciones optimas para estas secuencias durante el proceso de hibridación.

Una vez que se confirmó el alineamiento del DNA blanco sintético con las sondas de captura cuyas secuencias eran 100% complementarias, faltaba evaluar cual sería el patrón de hibridación entre el DNA blanco sintético y otras sondas cuya secuencia no fuera complementaria en su totalidad al DNA blanco sintético (por supuesto en el área de la sonda). Para ello pusimos a alinear cada DNA blanco sintético sobre un genesensor que contuviera el total de las sondas diseñadas para cada una de las variantes y cuya secuencia difería en al menos un nucleótido en cada una de las sondas depositadas con respecto al DNA blanco sintético. Los resultados que obtuvimos de esta prueba se muestran en la Figura 14, interesantemente cada una de las secuencias de DNA blanco sintético alineadas sobre el genesensor tanto de tipo silvestre como de tipo mutante se registraron solo en aquellos sitios donde se encontraba depositada la sonda complementaria en su totalidad al DNA blanco sintético de interés, por lo tanto, las pruebas de hibridación con DNA blanco sintético resultaron ser altamente específicas al registrarse señal solo en aquellos sitios donde las secuencias tanto del DNA blanco sintético y de las sondas eran 100 % complementarias. Cabe mencionar que en el caso del uso de DNA blanco sintético no se registró en ninguno de los casos alineamientos inespecíficos aún con periodos prolongados de exposición de la placa autoradiográfica. Lo anterior puede ser por que el DNA sintético en comparación con el DNA proveniente de cualquier organismo, carece casi en su totalidad de impurezas que puedan interferir en las pruebas de hibridación.

La detección de cada una las variantes se realizó por separado. Las primeras hibridaciones realizadas estaban enfocadas a la detección de las variantes AAa/c y AAC las cuales podrían ser definidas desde el amplificado A1. Un primer ensayo de la funcionalidad del genesensor en la detección de estas variantes se muestra en la Figura 15 a diferentes periodos de sobreexposición de la placa autoradiográfica. En esta prueba la hibridación de los controles positivos se

registra altamente específica (Fig. 15A y 15B) , es decir la señal de alineamiento entre la sonda de captura y un sitio específico de A1 (delimitado por los estabilizadores) se registra solo en el área donde la sonda es 100% complementaria. La diferencia de intensidades que se observa entre los controles W1 y W2, esta relacionada con el hecho de que se manejó la misma cantidad de DNA blanco tumoral en cada una de las hibridaciones, sin embargo la concentración del DNA blanco tumoral en la muestra W2 es menor con respecto a la muestra W1, por lo tanto un mayor número de secuencias de DNA blanco tumoral estaban presentes durante las hibridaciones realizadas en la Figura 15A, que las que estaban presentes en Figura 15B. Las hibridaciones realizadas con W1 y W2 ratifican su papel de controles positivos al registrarse señales solo en aquellos sitios donde se depositaron sondas que reconocen específicamente a la secuencia silvestre del HPV 16 de acuerdo con las bases presentes en los sitios 145→G y 183→T , cuyos sitios reconocen las sondas wt-AAa/c y wt-AAc.

Otras muestras fueron evaluadas en la Figura 15 como M3 y M4 que resultaron ser, según los sitios de hibridación sobre el genesensor, de tipo silvestre al igual que el grupo control, siendo M4 quien registró mayores intensidades de señal, posiblemente debido a diferencias en la concentración del DNA blanco tumoral. M1 y M2 también fueron evaluadas, sin embargo, ambos casos se registraron hibridaciones inespecíficas. Aunque se registraron señales inespecíficas en ambas muestras, las señales más intensas se presentaron en los sitios esperados cuyas secuencias eran complementarias en su totalidad.

Las hibridaciones registradas desde M1 en la Figura 15E sobre los genesensores muestran señal en diversos sitios donde sondas diferentes fueron depositadas como es el caso de los sitios de la wt-AAa/c, mut-AAa/c y wt-AAc, las señales registradas en los sitios de las sondas mut-AAa/c y wt-AAc se justifican por el hecho de que M1 de acuerdo con la secuencia que ya conocíamos con anterioridad posee la mutación 145 la cual fue reconocida por la sonda mut-AAa/c, pero no la mutación 183 lo cual reconoció plenamente la sonda wt-AAc, pues si bien no presentaba la mutación en cuestión obviamente tenía que presentar la misma secuencia que el HPV 16 de referencia la cual estaba representada en esta sonda específicamente en ese punto de mutación. La hibridación inespecífica en el área de la sonda wt-AAa/c hasta cierto punto se esperaba debido a la similitud en secuencia con respecto a la sonda mut-AAc difiriendo una de otra en una sola base, pero aunque se registro señal en este sitio la intensidad de la señal es aún mas intenso en la sonda que es 100% complementaria, es decir en la sonda mut-AAc.

Algo parecido se presento en el caso de la muestra M2 en la Figura 15F pues señales inespecíficas se registraron en el área de las sondas wt-AAa/c y wt-AAc, sin embargo, al igual que en caso anterior es posible que debido al parecido en secuencia con respecto a las sondas mutantes ligeros entrecruzamientos hayan resultado, además las hibridaciones inespecíficas nunca fueron más intensas que la señales registradas en los sitios esperados (ver Figura 26A). Las señales esperadas son las registradas en el área de las sondas mut-AAa/c y mut-AAc pues

por secuenciación se sabía que esta muestra presentaba la mutación 145 que detecta la sonda mut-AAa/c y la mutación 183 que detecta la sonda mut-AAc.

La Figura 16 muestra las hibridaciones que resultaron de un incremento de la cantidad de DNA blanco tumoral a alinear sobre los genesensores con respecto a las mostradas en la Figura 15, los resultados obtenidos básicamente fueron los mismos en una y otra figura, sin embargo, hibridaciones mas intensas fueron registradas debido al aumento en la cantidad de DNA blanco tumoral a alinear y en parte a que los períodos de sobreexposición de las placas autoradiográficas fue mayor que las mostradas en la Figura 15. los diferentes tiempos de exposición y sobreexposición de las placas autoradiográficas son importantes por el hecho de que a mayor tiempo de exposición mayor intensidad de señal en el área de interés y mayor posibilidad de visualizar posibles hibridaciones inespecíficas que a veces durante tiempos cortos de exposición no serían visibles (ver Figura 16 A-E).

Una de las posibles causas de señales inespecíficas según diversas investigaciones aún en proceso, es el hecho de que en una sola muestra exista de manera conjunta más de un tipo o variante viral, conocidas con el nombre de coinfecciones. Se cree que durante el proceso de amplificación e hibridación este tipo de coinfecciones se estén manifestando y que el hecho de registrar mas de un sitio de hibridación y diferencias en las intensidades de señal es por que quizá más de una variante viral pueda estar presente en una misma muestra y que además quizá en un número mayor de copias con respecto a la otra variante, es decir que hoy en día es posible que en una misma persona varios sean los tipos o variantes virales los que estén jugando algún papel dentro de la carcinogenesis celular.

Sin embargo, es muy posible que las señales inespecíficas registradas sobre los genesensores, mostradas en la Figura 15 (A, C, D y E) y 16 (E y F) con las muestras W1, M1, M2 y M4 (visibles sobre todo en periodos prolongados de sobreexposición de las placas autoradiográficas), sean una consecuencia de apareamientos muy estables entre algunas bases presentes en sitios específicos dentro de una secuencia de interés, aunque no sean complementarias en su totalidad, lo que podría resultar en señales débiles de hibridación en sitios no esperados. Dentro de los apareamientos erróneos en el DNA, el más estable es el que forman los nucleótidos G:A, el cual además puede verse favorecido por la presencia de bases de A en la contigüidad de la secuencia blanco cercanas a sitios importantes, como lo es el área de captura de las sondas.

En la discriminación de mutaciones puntuales la presencia de bases G y A en el área de captura de las sondas pueden jugar un papel crucial en la detección específica de secuencias, sobre todo si la mutación puntual de interés es alguna de estas dos bases, pues se favorece la aparición de apareamientos inespecíficos entre el DNA blanco y las sondas de captura no del todo complementarias. Lo anterior justificaría en cierto modo la presencia de ligeras señales inespecíficas sobre los genesensores en sitios no esperados a causa de que en el caso de las variantes AAa/c y AAC, el diseño de las secuencias de detección de ambas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

variantes contempla la presencia, en el punto de mutación, de los pares G:C y T:A como pares susceptibles a ser discriminados por las sondas, lo que favorece apareamientos inespecíficos entre ellas formando pares G:A y T:C que pueden llegar a ser muy estables, lo anterior fue favorecido además, por la presencia de bases de Adeninas en uno (mutación 145 → AAa/c) o ambos extremos (mutación 183 → AAC) del punto de mutación de estas variantes dentro de la secuencia del DNA blanco de interés (ver diseño en Figuras 6 a 9).

El efecto de los lavados a las sondas, previos a su fijación sobre los genesensores para evaluar el efecto de los grupos aminos libres que pudieran competir con las sondas por los espacios disponibles sobre la superficie del portaobjeto convencionales se muestran en la Figura 18. No se encontraron diferencias significativas entre sondas lavadas y sin lavar en cada una de las hibridaciones realizadas, solo un ligero incremento en la señal de hibridación se muestra en el área donde se fijaron las sondas lavadas según el análisis cuantitativo realizado sobre los genesensores correspondientes a estas muestras (ver Figura 27).

Una de la pruebas clave en la comprobación de la eficacia a bajo costo de nuestro genesensor sobre otros biochips comerciales se muestra en la Figura 19. En ella al igual que en la Figura 18, se evalúa el efecto de las sondas lavadas y sin lavar en la detección de las variantes AAa/c y AAC pero ahora usando como matriz de soporte un Creative Chips Microarray, cuya superficie tenía un tratamiento especial "que facilitaría la fijación de sondas y la detección específica de secuencias", sin embargo los resultados obtenidos en este experimento y bajo nuestras condiciones de trabajo, reflejan a simple vista bajas señales de hibridación sobre la superficie del Creative Chips Microarray aun con periodos prolongados de sobreexposición de la placa autoradiográfica. Esto es apoyado por el análisis cuantitativo realizado a cada uno de los microarreglos comerciales donde notablemente son escasas las señales en los sitios esperados (ver Figura 27), mientras que en algunos sitios donde no se esperaba señal, si fueron registradas (ver Figura 28).

Estos resultados se hacen más evidentes al comparar las hibridaciones obtenidas desde nuestro sistema genesensor con las del Creative Chip Microarray como podemos observar en la Figura 20. Como se puede apreciar, un mayor número de alineamientos específicos fueron obtenidos desde nuestro sistema genesensor en comparación con las registradas en los Creative Chips, incluso en los genesensores fue mayor la discriminación de alineamientos inespecíficos con respecto a los Creative Chips Microarray ya que no registra alineamiento alguno de secuencias en el área de la sonda mut-AAC (Figura 20B) a diferencia del Creative Chip Microarray quien si presenta señales de hibridación donde no debería de registrar ya que la muestra alineada sobre estos microarreglos no presenta la mutación que esta reconociendo dicha sonda. Estas pruebas resaltan la utilidad de nuestro sistema como un eficaz medio de detección oportuna de

variante virales de una manera confiable, rápida y a precios muy accesibles (ver análisis cuantitativo, Figuras 27 y 28).

Una última prueba se llevo a cabo sobre los genesensores con muestras positivas para AAa/c (M1) y AAc (M2). Para ello diferentes diluciones del DNA blanco de cada una de las muestras fueron evaluadas. Los resultados de las pruebas se muestran en la Figuras 21 para M1, en la Figura 22 para M2 y en la Figura 23 para M3. Los alineamientos registrados en cada una de las figuras son después de tres días de exposición de la placa autoradiográfica, por lo que los alineamientos inespecificos aún no son muy visibles, sin embargo, largos periodos de sobreexposición de la placa fueron realizados, no se reportan esos resultados a causa de una mala apreciación de las hibridaciones después del scaneo de las imágenes. Lo que podemos deducir de las Figuras 21, 22 y 23 es que efectivamente la dilución del DNA blanco resulta en una disminución de las señales de hibridación, incluso en el caso de las imágenes no reportadas para esta prueba hay una reducción notable de las hibridaciones inespecificas sobre los genesensores, al menos en cortos periodos de sobreexposición de la placa autoradiográfica.

Otra de las estrategias reportadas para reducir al mínimo la presencia de señales inespecificas durante las reacciones de hibridación la reporta Loyola, 1998 quien menciona que la intensidad de las señales de hibridación disminuye con el aumento de la temperatura de hibridación, obteniéndose señales de buena intensidad y apropiada discriminación (aumento de las condiciones de astringencia).

De las Figura 24 y 25 podemos deducir que la detección de la variante E desde el diseño propuesto en este trabajo resultó ser altamente especifico ya que en ninguno de los casos se registran alineamientos inespecificos con otras sondas que no sean totalmente complementarias aun con periodos prolongados de re-exposición de las placas autoradiográficas, sobre todo si comparamos estas hibridaciones con las obtenidas para la variante AAa/c y AAc donde si se registraron ligeros entrecruzamientos con sondas no 100% complementarias, los cuales se hacían más visibles conforme se incrementaba el periodo de re-exposición de las placas autoradiográficas. Además fue detectada una muy buena señal de hibridación en los sitios esperados sobre los genesensores, a pesar de ser productos de amplificación obtenidos bajo condiciones distintas de temperatura de alineamiento y concentración de Mg⁺. En general las mejores señales de hibridación fueron obtenidas con productos de amplificación obtenidos a una temperatura de alineamiento de 43 °C con 2.5 mM de Mg⁺ (ver Figura 26). Sin embargo, un análisis más detallado de las hibridaciones obtenidas sobre los genesensores bajo las diferentes condiciones de amplificación de Caski se muestra en la Figura 26, cuyo análisis cuantitativo confirma la plena identificación de la variante E del HPV 16.

Estos resultados confirman lo reportado por Meissner, et al., 1999, quienes encuentran que Caski presenta la mutación 350 T→G, lo que significa que esta línea celular tiene integrado en su genoma el HPV 16 correspondiente a la variante E y más específicamente a la variante EUR-40G según las hibridaciones obtenidas desde nuestro genesensor.

7.4 El biochip de DNA (tipo genesensor) en comparación con otros sistemas de detección de HPV 16.

La diversidad en la secuencia dentro de los diferentes tipos de HPV, pero sobre todo el papel de las diferentes variantes en la carcinogénesis cervical, aun no ha sido investigada ampliamente. Aunque es bien reconocido que un individuo puede ser simultáneamente infectado con múltiples tipos de HPV, la distribución en la población de las infecciones con variantes intratípicas de HPV y su prevalencia en múltiples infecciones, no han sido exploradas adecuadamente. Se sabe que variantes del HPV pueden presentar diferente potencial oncogénico, lo que puede permitirles diferir funcionalmente y quizás convertirlas en importantes factores de riesgo para el desarrollo de lesiones o neoplasias cervicales (Emeny, et. al., 1999).

En la actualidad ni la prevalencia, ni la significancia de las variantes del HPV en muestras clínicas han sido bien establecidas. Ambas, tanto la secuenciación directa de DNA proveniente de productos de PCR, como el análisis de moléculas de PCR clonadas sufren diferentes tendencias al tratar de distinguir infecciones causadas por una sola variante o por mezclas de variantes de HPV (Emeny, et. al., 1999). De aquí la importancia de evaluar y mejorar los métodos existentes disponibles para la detección de infecciones causadas por variantes de HPV, especialmente en el contexto de investigaciones epidemiológicas a gran escala.

Diversas investigaciones han tratado de evaluar el rendimiento de las técnicas empleadas en la detección de variantes del HPV, como la de Emeny, et. al., 1999 quienes evaluaron técnicas como la hibridación variante específica (VSH) y el análisis de polimorfismo conformacional de cadena sencilla (SSCP) en la detección de infecciones con mezclas de variantes de HPV 16 en muestras clínicas (tanto la VSH como el análisis SSCP detectan mezclas de variantes, pero cada una con diferentes sensibilidades). Ellos detectan tres importantes áreas en las cuales ambos métodos difieren; en la variedad de variantes de HPV que cada sistema puede detectar, en la intensa labor que requiere cada método y en la habilidad de cada método por identificar con precisión infecciones con mezclas de variantes de HPV 16. Sus resultados los llevan a concluir que el análisis SSCP es menos sensible que la VSH en la identificación de mezclas de variantes de HPV 16 en muestras clínicas, aun que una de las ventajas de el análisis SSCP es menos laborioso que la VSH, sin embargo la sensibilidad de la VSH puede verse afectada por la concentración de DNA depositada sobre la membrana de hibridación, lo que representa una gran desventaja al analizar muestras con

diferentes variantes de HPV 16 presentes en un número bajo de copias, las cuales no se lograrían detectar por esta metodología. Aunque el SSCP ha sido uno de los métodos más ampliamente usados en la búsqueda de mutaciones, solo es capaz de detectar su presencia o ausencia desde un producto específico de PCR, pero no es capaz de identificar cual es el cambio preciso en la secuencia, por lo que análisis de secuenciación son requeridos adicionalmente incrementando costos y tiempos de procesamiento de las muestras.

Otras de las técnicas ampliamente usada en la detección de tipos del HPV en muestras clínicas son las pruebas por medio de captura híbrida (HCT y HCT II), las cuales se basan en la formación de híbridos DNA-RNA entre el DNA proveniente del HPV que pueda estar presente en las muestras clínicas y el RNA del HPV complementario usado como sonda. Aquí, los híbridos DNA-RNA son capturados e inmovilizados por anticuerpos antihíbridos, los híbridos inmovilizados reaccionan con anticuerpos monoclonales acoplados a una fosfatasa alcalina, así el complejo es detectado vía la reacción con un sustrato quimioluminiscente. La presencia o ausencia del HPV esta basada en la comparación de referencias positivas estándar. Ambas técnicas hacen posible la detección de diferentes tipos de HPV, sin embargo la HCT detecta solo un número limitado de ellos (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 y 56), lo que la ubica en un nivel de sensibilidad parecido al de un simple papanicolau. La HCT II registra una mayor sensibilidad de detección de tipos de HPV hasta 10 veces mayor en comparación con la HCT detectando además a los tipos 39, 58, 59 y 68. Una de las ventajas potenciales de esta técnica es que puede proveer de una medición semicuantitativa de la carga viral, sin embargo, la utilidad de la prueba podría restringirse al detectar solo un cierto número de tipos diferentes del HPV de alto riesgo y su uso en la detección específica de tipos virales de alto riesgo podría reducirse solo al número de sondas de RNA de HPV disponibles en ese momento (Peyton, et. al., 1998). La especificidad en la formación de híbridos de DNA-RNA también podría verse afectada por el apareamiento intracadena de bases no complementarias pero hasta cierto punto estables que mantendrían el híbrido pero que ocultarían la presencia de ciertas variantes virales específicas que pudieran estar presentes una misma muestra, no hay que olvidar que en la mayoría de los casos lo que distingue a una variante viral de otra son cambios a veces tan sutiles como lo es el cambio de una sola base por otra en una secuencia específica del genoma del HPV. Finalmente la captura híbrida además de ser una técnica muy laboriosa y cara por el uso de sondas de RNA y anticuerpos, restringe la identificación de HPV solo a ciertos tipos virales, siendo no aplicable en la detección específica de variantes y no aplicable en estudios epidemiológicos a gran escala.

En este sentido el Biochip de DNA (tipo genesensor) propuesto por nuestro grupo de trabajo es una nueva tecnología que esta diseñada para la detección de variantes del HPV 16 con algunas ventajas que pueden hacer de este sistema una herramienta de gran utilidad en investigaciones epidemiológicas donde se requiere el análisis de un gran número de muestras clínicas que nos permitan llegar al entendimiento del posible papel que cada una de las variantes del HPV 16 juegue en la carcinogénesis cervical. Algunos de sus posibles beneficios serían el

proporcionar con una alta precisión no solo los tipos del HPV, sino la o las variantes específicas del HPV 16 presentes en una misma muestra durante un solo ensayo de hibridación, también sería posible detectar un gran número de diferentes tipos de HPV con sus respectivas variantes en una misma prueba, se podría realizar el análisis simultáneo de más de una muestra clínica a la vez en cada hibridación (marcando cada una de las muestras a analizar con un fluorocromo distinto), la concentración de DNA ($\text{pmol}/\mu\text{l}$) de los productos de PCR a analizar sobre el genesensor en los estudios realizados hasta hoy ha sido mínima lo que incrementa la sensibilidad de detección de variantes virales presentes en muestras clínicas con un bajo número de copias virales que con otras metodologías no podrían ser detectadas (Wheeler, et. al., 1997), el uso de estabilizadores prealineados al DNA blanco incrementan la estabilidad del sistema y la detección específica de variantes virales, además resulta ser una técnica de fácil manejo y de bajo costo, lo que en estudios a gran escala podría representar ahorro de tiempo, esfuerzo y dinero con una alta especificidad y confianza favoreciendo entre otras cosas un mejor pronóstico y diagnóstico de la enfermedad.

El Biochip de DNA (tipo genesensor) para la detección de variantes AA y E del HPV 16 es solo una parte de un proyecto global donde se pretende ampliar su aplicación a la detección de tipos específicos de HPV considerados como de alto riesgo en el desarrollo de lesiones cervicales y / o progresión hasta ICC (contemplando en algunos casos variantes específicas para estos tipos virales), como parte de una estrategia que nos permita la detección viral de una manera rápida, económica y precisa. Esto facilitaría al análisis de muestras clínicas en estudios epidemiológicos a gran escala y nos permitiría realizar investigación de gran nivel en áreas biomédicas con aplicaciones clínicas. Además permitiría analizar la significancia biológica de ciertas variantes específicas en el desarrollo de lesiones y / o neoplasias cervicales, donde el factor etiológico de mayor riesgo para desarrollar el ICC es el HPV y cuya patología hoy en día representa un gran problema de salud pública, al ser la primer causa de muerte en mujeres mayores de 30 años. En este sentido, su utilidad también se podría extender a otros países, donde las muertes por ICC asociadas con algún tipo de HPV ocupa ya los primeros lugares como causa de mortalidad en mujeres de todo el mundo. Esto tendría repercusiones muy importantes en el ámbito de la salud pública en cuanto al mejor pronóstico y diagnóstico de enfermedades enfocados a mejores y más efectivos métodos de tratamiento de la enfermedad.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

SUGERENCIAS PARA TRABAJOS FUTUROS

- Implementar sistemas de detección sobre los genesensores con métodos no radiactivos.
- Hibridar sobre los genesensores el DNA de un número mayor de muestras clínicas provenientes de pacientes con lesiones cervicales y /o tumorales.
- Probar hibridaciones sobre los genesensores con mezclas de tipos, variantes y / o subvariantes del HPV.
- Realizar cinéticas de hibridación a diferentes temperaturas y tiempos de alineamiento sobre los genesensores con muestras de DNA blanco tumoral.
- Disminuir el tamaño de las sondas de captura de 9 nt a 7 nt de longitud y modificar las condiciones de astringencia, con la finalidad de incrementar la especificidad en la detección de mutaciones puntuales desde secuencias blanco y reducir al mínimo los alineamientos inespecíficos.
- Desarrollar un Biochip de DNA que permita la detección de un número mayor de tipos y variantes virales específicas.

REFERENCIAS

Ahrendt SA, Halachmi S, Chow JT, Wu I, Halachmi N, Yang SC, Wehage S, Jen J and Sindrasky D. 1999. Rapid p53 sequence analysis in primary lung cancer using an oligonucleotide probe array. Proceedings National Academic Science USA. 96: 7382-7387.

Barrera- León, et. al., 2003. (en prensa)

Berumen J., Ordoñez R. M., Lazcano E., Salmerón J., Galván S., Carranca-García, Gonzales-Lira y Madrigal- de la Campa. 2001. Asian American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. Journal National Cancer Institute. 93(17): 1325-1330.

Beattie K, Beattie W, Meng L, Turner S, Bishop C, Dao D, et al. 1995. Advances in Genosensor research. Clinical Chemistry. 41: 700-706.

Beattie KL, Eggers MD, Shumaker JM, Hogan ME, Varma RS, Lamture JB, Hollis M, EhrlichD, and Rathman D. 1993. Genosensor technology. Clinical Chemistry. 39: 719-722.

Beattie WG, Meng L, Turner S, Varma RS, Dao DD and Beattie KL. 1995. Hybridization of DNA targets to glass-tethered oligonucleotide probes. Molecular Biotechnology. 4: 213-225.

Beattie, K. L. and Maldonado-Rodríguez, R. 2001. Nucleic Acid Analysis using sequense-targeted tandem hybridization. US patent. 6, 268, 147 B1.

Bohm, S., Wilczynsky, SP., Pfister H. And T. Iftner. 1993 The predominant mRNA class in HPV16-infected genital neoplasias does not encode the E6 or the E7 protein. Institute Journal Cancer: 55, 791-798.

Burk, R. 1999. Human papilloma virus the risk of cervical cancer. Hospital practice. pp. 103-111

Casas L., Galvan S. C., Ordoñez R. M., López N., Guido M., Berumen J. 1999. Asian -American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. Institute Journal Cancer. 83: 449-455.

Celis JE, Kruhøffer, Gromova I, Frederiksen C, Østergaard M, Thykjaer T, Gromov P, Yu J, Pálsdóttir H, Magnusson N, Ørntoft TF. 2000. Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. FEBS Letters; 480: 2-16.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Cheung, V. G., Morley, M., Agular, F., Massimi A., Kucherlapati, R., and Chils, G. 1999. Making and reading microarrays. *Nature Genetics Supplement*. 21; 15-19.
- Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Morbilidad y mortalidad 1993-1996. Regionalización. Años de vida potencialmente perdidos 1985-1995. Secretaría de Salud, 1998.
- Conner BJ, Reyes AA, Morin C, Itakura K, Teplitz RL, Wallace RB. 1983. Detection of sickle cell beta S-globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proceedings National Academic Science. USA*. 80: 278-82.
- Emeny, R., Herron, J., Fu Xi, L., Kotsky, L., Kiviat, N. And Wheeler, C. 1999. Comparison of variant-specific hybridization and single-strand conformational polymorphism methods for detection of mixed human papillomavirus type 16 in variant infections. *Journal on Clinical Microbiology*. 37(11): 3627-3633.
- Epstein, C. B., and Butow, R. 2000. Microarray technology – enhanced versatility, persistent challenge. *Curr. Op. Biotechnology*. 11: 36-41.
- Eschle, D., Durst, M., ter Meulen, J., Luande, J., Eberhardt, H. C., Pawlita, M and Gissman, L. 1992. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *Journal of General Virology*. 73: 1829-1832.
- Favre, M., Ramoz, N. and Orth G. 1997. Human papillomaviruses: general features. *Clinics in Dermatology*. 15: 181-198.
- Freeman WM, Robertson DJ, Vrana KE. 2000. Fundamentals of DNA hybridization arrays for gene expression analysis. *Biotechniques*. 29: 1042-6, 1048-55.
- Gravitt, P., Peyton, C., Apple, R. And Wheeler, C. 1998. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(10): 3020-3027.
- Greer, C., Wheeler, C., Ladner, M. And Ralston, R. 1995. Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital wart. *Journal of Clinical Microbiology*. 33(8): 2058-2063
- Hacia JG, Brody LC, Chee MS, Fodor SPA, and Collins FS. 1996. Detection of heterozygous mutations in BRCA 1 using high density oligonucleotide arrays and two-color fluorescence analysis. *Nature Genetic*. 14: 441-447.
- Heller MJ. 1994. Fluorescent detection methods for PCR analysis. In: *The Polymerase Chain Reaction*. Mullis KB, Ferré F, and Gibbs RA. Birrkhäusen, Boston, pp: 134-141.

Hidalgo, A. y Salcedo, M. 2001. Estrategias de análisis global. Hacia el manejo genético de las neoplasias. *Revista de Investigación Clínica*. 53(5): 430-443.

Hildesheim, A., Shifman, M. And Sherman M. 2001. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 93(4):315-318.

Ho, L., Chan, S-Y., Chow, V., Chong, T., Tay, S-K., Villa, L. L., and Bernard, H-U. 1991. *Journal Clinical Microbiology*. 29(9): 1765-1772.

Hussain SP, Harris CC. 1998. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Research*. 58: 4023-4037.

Hussain SP, Harris CC. 2000. Molecular epidemiology and carcinogenesis: endogenous and exogenous carcinogens. *Mutations Research*. 462: 311-322.

Kammer, C., Warthorst, U., Torrez-Martinez, N. And Wheeler, C. 2000. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variant and functional consequences for P97 promoter activity. *Journal Genetic Virology*. 81:1975-1981.

Khan J, Bittner ML, Chen Y, Meltzer PS, Trent JM. 1999. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. *Biochemistry Biophysic Acta*. 1423: M17-M28.

Lockhart, D. J. and Winzeler, E. A. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*. 405: 827-836.

Loyola, A. P. 1998. Hibridación con alineamiento contiguo en el genesensor. Tesis Maestría. ENCB-IPN, Depto. Bioquímica. Págs. 93.

a) Maldonado-Rodríguez R, Espinosa-Lara M, Calixto-Suárez A Beattie WG, and Beattie KL. 1999. Hybridization of glass-tethered oligonucleotide probes to target strands preannealed with labeled auxiliary oligonucleotides. *Molecular Biotechnology*. 11: 1-12.

b) Maldonado-Rodríguez R, Espinosa-Lara M, , Loyola-Abitia P, Beattie WG, and Beattie KL. 1999. Mutation detection by stacking hybridization on genesensor arrays. *Molecular Biotechnology*. 11: 13-25.

Maldonado- Rodríguez, R. and Beattie, L. 2002. Analysis of nucleic acid by tandem hybridization on oligonucleotide microarrays. *Method in Molecular Biology*. 170: 157-171.

- Maskos u and southern EM. 1992. Parallel analysis of oligodeoxyribonucleotide (oligonucleotide) interactions. I. Analysis of factors influencing oligonucleotide duplex formation. *Nucleic Acids Research*. 20: 1675-1678.
- Meissner J. 1999. Nucleotide sequence and further characterization of human papillomavirus DNA present in the Caski, SiHa, and Hela cervical carcinoma cell lines. *Journal of General Virology*. 80: 1725-1733.
- Méndez-Tenorio, A, Beattie, K.L., Doktycz, M.J., Maldonado-Rodríguez, R., Guerra Trejo, A. and Reyes-López, M.A. 2003. Design of Oligonucleotide Probes for Genosensor Chips and Virtual Hybridization (Enviado a Bioinformatics).
- Mirzabekov AD. 1994. Dna sequencing by hybridization—a mega sequencing method and a diagnostic tool ? *Trends Biotechnology*. 12: 27-32.
- Nikiforov TT, Rendle RB, Goelet P, Rogers YH, Kotewicz ML, Anderson S, et al. 1994. Genetic bit analysis: a solid phase method for typing single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Research*. 22: 4167-4175.
- Panduro, A. 2000. *Biología molecular en la clínica*. México, Mc-Graw Hill interamericana, pp. 129-140.
- Parinov S, Barsky V, Yershov G, Kirillov E, Tirnofeev E, Belgovskiy A, et al. 1996. DNA sequencing by hybridization to microchip octa-and decanucleotides extended by stacked pentanucleotides. *Nucleic Acids Research*. 24: 2998-3004.
- Peace AC, Solas D, Sullivan EJ, Cronin MT, Holmes CP, and Fodor SP. 1994. Light generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proceedings National Academic Science. USA*. 91:5022-5026.
- Peyton, C., Schifman, M., Lorincz, A., Hunt, W., Mielzinska, I. And Wheeler, C. 1998. Comparison of PCR- and hybrid capture-based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(11): 3248-3254.
- Piña, P. 2003. Expresión de las proteínas de adhesión CD44 en cáncer cervicouterino infectado con virus de papiloma humano. Tesis de Maestría. Depto. Bioquímica. ENCB-IPN.
- Rangel, A. 2000. Nuevo diseño del sistema genesensor (Chip de DNA) para detección de mutaciones en el gen p53: uso en cáncer de pulmón. Anteproyecto de tesis doctoral. CMN-SXX1, IMSS- Oncología.
- Reyes-Lopez, M. A., Mendez-Tenorio, A., Maldonado-Rodríguez, R., Doktycz, M. J., Fleming, J. T., Beattie, K. L. 2003. Fingerprinting of prokaryotic 16S rRNA genes using oligodeoxyribonucleotide microarrays and virtual hybridization. *Nucleic Acids Research*. 31: 779-789.

Smith MJ, Humphrey KE, Cappai R, Beyreuther K, Masters CL, Cotton RG. 2000. Correct heteroduplex formation for mutation detection analysis. *Molecular Diagnostic*. 5: 67-73.

Southern EM, Maskos U, and Elder JK. 1992. Analyzing and comparing nucleic acid sequences by hybridization to arrays of oligonucleotides: evaluation using experimental models. *Genomics*. 13: 1008-1017.

Southern EM. 1996. DNA chips: analysis sequence by hybridization to oligonucleotides on a large scale. *Trends Genetic*; 12: 110-115.

Terris M. And Donna Peehl. Human papillomavirus detection by polymerase chain reaction in benign and malignant prostate tissue is dependent on the primer set utilized. 1997. *Urology* 50(1): 150-156.

Vogelstein B. 1990. *Nature*. 348: 681.

Wheeler, C., Yamada, T., Hildesheim, A. and Jeninson, S. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*. 35(1): 11-19

Yamada, T., Wheeler C., Halpern A., Stewart A., Hildesheim A. and Jenson S. 1995. Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2 and L1 coding segments. *Journal of Virology*. 69:7743-7753

Yamada, T., Manos, M.M., Peto, J., Greer, C., Muñoz, N., Bosh, X. And Wheeler, C. 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancer: a worldwide perspective. *Journal of Virology*. 71(3): 2463-2472

Yershov G, Barsky V, Belgovskiy A, Kirillov E, Kreindlin E, Ivanov I, et al. 1996. DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips. *Proceedings National Academic Science USA*; 93: 4913-4918.

Walboomers, J. M. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosh, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., Peto, J., Meijer, C. J. L. M., and Muñoz, N. 1999. Human papillomavirus is necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal Pathology*. 189: 12-19.

Wallraff, G., Labadie, J., Brock, P., DiPietro, R., Nguyen, T., Huynh, T., Hinsberg, W. and McGall, G. 1997. DNA sequencing on a chip. *Chemistry Technology*. February, 22-32.

Wooster, R. 2000. Cancer classification with DNA microarrays is less more? *TIG*: 16(8): 327-329.

