



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO

CAMPUS CHAPULTEPEC

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO  
INCORPORADA A UNAM

“VALIDACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE UN  
PROTOCOLO DE DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN  
DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO  
RIESGO (HPV 16/18) A PARTIR DE MUESTRAS DE  
LESIONES CERVICALES MEDIANTE EL USO DE  
LA PCR EN TIEMPO REAL”

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA**  
P R E S E N T A :  
**CINTHIA PEREA MONTOYA**

DIR. DE TESIS: M en C. JUAN ANTONIO GIMENEZ SCHERER  
DR. HORACIO ASTUDILLO DE LA VEGA

MÉXICO, D.F

2006



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.

## **JURADO ASIGNADO**

|              |                                      |
|--------------|--------------------------------------|
| Presidente   | M en C. Juan Antonio Giménez Scherer |
| Vocal        | Q.F.B. Javier Araiza Santibáñez      |
| Secretario   | Q.F.B. Gerardo García Camacho        |
| 1er Suplente | M. en C. Eduardo del Rey Pineda      |
| 2º Suplente  | Dr. Guillermo del Rey Pineda         |

Este trabajo se realizó en Centro Médico Nacional SXXI, en la Unidad de Investigación Medica en Enfermedades Oncológicas, en el Laboratorio de Oncología Molécula, en el Distrito Federal.

\_\_\_\_\_  
Dr. Juan Antonio Giménez Scherer  
**Director de Tesis Interno**

\_\_\_\_\_  
Dr. Horacio Astudillo de la Vega  
**Director de Tesis Externo**

\_\_\_\_\_  
Cinthia Perea Montoya  
**Sustentante**

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por enseñarme a ser dulce y delicada en todos los acontecimientos de la vida; en los desagradables; en la inconsideración de otros; en la insinceridad de aquéllos en quienes confiaba; en la falta de fidelidad y de lealtad de aquéllos en quienes yo creía. Por enseñarme a aprovechar el sufrimiento que se presente en mí camino.

A mis papas (abuelos), por protegerme con su amor y sabiduría, por compartir conmigo sus vivencias, por enseñarme a trabajar y a nunca darme por vencida.

A mis padres, por darme la oportunidad de vivir, de crecer, por apoyar mis decisiones y por hacerme independiente sin dejar de cuidar de mis pasos.

A mi hermano, por ser como es, por mostrarme sus errores y defectos para que yo aprendiera.

A mis tíos, por guiarme en mi juventud, por ser mis amigos y por enseñarme que lo más importante y valioso es la unión en la familia.

A S. Margarita, por siempre estar a mi lado en las buenas y en las malas, por ser sincera, mostrarme mis errores y enseñarme el valor de la amistad incondicional.

A Alejandra, por apoyarme y presionarme a terminar esta etapa de mi vida, por brindarme tu amistad.

A mi profesor y amigo Juan Antonio Giménez Scherer, por confiar y creer en mí en todo momento y por ayudarme a enfocar mis aptitudes.

Al Dr. Horacio Astudillo, por abrirme las puertas en su laboratorio, apoyarme, cuidarme y guiar mi camino dentro de la Investigación Científica.

A mis amigas Betzabeth, Liliana y Denys, por vivir conmigo esta etapa de la carrera, por soportar mis exigencias dentro del aula y brindarme su amistad aun estando en caminos diferentes.

A Juan Carlos, por no cortarme las alas y permitirme alcanzar mis metas, siempre vas a tener un lugar muy especial en mi corazón.

A mis compañeros y amigos de Centro Médico Nacional SXXI, por hacer mi día menos pesado y llenarlo de alegría.

A todas mis amistades que están fuera del ámbito profesional, mil GRACIAS por enseñarme que hay un mundo fuera del Laboratorio.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| I. ..RESUMEN.....  | 2  |
| II. ..ABSTRACT.....  | 3  |
| III. ANTECEDENTES  |    |
| 1. Generalidades.....  | 4  |
| 2. Virus del papiloma humano (HPV) y cáncer.....                                   | 5  |
| 3. Métodos de detección del HPV.....   | 11 |
| 4. Tratamientos del HPV.....   | 15 |
| 5. PCR tiempo real en el diagnóstico clínico.....                                  | 16 |
| IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....  | 22 |
| V. HIPOTESIS.....  | 22 |
| VI. OBJETIVO GENERAL.....  | 23 |
| VII. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....  | 23 |
| VIII. MATERIAL Y METODOS   |    |
| 1. Diagrama de Flujo.....  | 24 |
| 2. Obtención de Muestra.....   | 25 |
| 3. Extracción de DNA.....  | 25 |
| 4. Cuantificación del DNA.....   | 26 |
| 5. PCR en tiempo real.....   | 27 |
| IX. RESULTADOS   |    |
| 1. Cuantificación .....  | 28 |
| 2. Estandarización .....   | 30 |
| 3. Detección y Tipificación.....   | 39 |
| X. DISCUSIÓN.....  | 41 |
| XI. CONCLUSIONES.....  | 45 |
| XII. REFERENCIAS.....  | 46 |
| XIII. GLOSARIO.....  | 52 |
| XIV. ANEXOS  |    |
| 1. Protocolo propuesto.....  | 54 |
| 2. Carta de aceptación para el XIV Foro Nacional de<br>Investigación en Salud..... | 56 |
| 3. Constancia.....   | 57 |
| 4. Cartel.....   | 58 |

## I. RESUMEN

Las infecciones por Virus del Papiloma Humano (HPV) se han identificado Epidemiológicamente como el mayor factor de riesgo asociado al desarrollo de cáncer de cérvix, el cual es comúnmente transmitido por vía sexual. El cáncer cervical es la 2ª causa mas frecuente de muertes por cáncer en las mujeres de todo el mundo. Actualmente se han identificado más de 100 tipos de HPV. El HPV infecta las membranas epiteliales y mucosas. Es clasificado en diferentes tipos dependiendo de las homologías en su material genético. El método de la PCR punto final es el más comúnmente utilizado para su detección.

Tenemos como objetivo desarrollar una metodología rápida y sensible basada en la PCR tiempo-real para la detección y tipificación de HPV de alto riesgo a partir de muestras clínicas de mujeres con diferentes grados de lesiones cervicales (n=100), se extrajo el DNA por el método de columnas de silica-gel, se cuantificó el DNA por espectrofotometría y se diseñó un protocolo utilizando los oligos MY09/11 para PCR en tiempo real. Se analizaron 100 muestras de cepillados cervicales. Se emplearon como controles positivos: un vector plasmídico con el genoma del HPV16 y el DNA de la línea celular Hela como control positivo para HPV18. Los resultados mostraron una alta eficiencia para la genotipificación de las muestras HPV positivas para los tipos 16/18.

Se demostró que la técnica de amplificación del gen L1 del HPV utilizando los oligos MY09 y MY11 en la plataforma de PCR tiempo-real es un método sensible y muy rápido para la detección de los genotipos de alto riesgo (HPV 16/18). Este método garantiza una prueba de detección de 1 hora para la genotipificación de los HPV de alto riesgo 16/18, la cual podría implementarse en la clínica como un método rápido de monitoreo.

## II. ABSTRACT

The infections by Human Papillomavirus (HPV) have been identified Epidemically as the bigger factor of risk associated to the development of cervical cancer, which is commonly transmitted for via sexual. The cervical cancer is the 2nd cause but it frequents of deaths for cancer in the women from all over the world. At the moment they have been identified more than 100 types of HPV. The HPV infects the epithelial and mucous membranes. They are classified in different types depending on homologies in their genetic material. The method of the final point PCR is the most commonly used for HPV detection.

We have as objective to develop a quick and sensitive methodology based on the real time PCR for the detection and type-specific of HPV of high risk starting from women's clinical samples (n=100) with different grades of cervical lesions, the DNA was extracted by silica-gel columns method. The DNA was quantified by spectrophotometry and a protocol was designed using the primers MY09 and MY11 for real time PCR. 100 samples of cervical brushings were analyzed. They were used like positive controls: a plasmid vector with the genome of the HPV16 and the DNA of the cellular line HeLa like positive control for HPV18. The results shown a high efficiency for the type-specific genome of the samples positive HPV for the types 16/18.

It was demonstrated that the amplification technique of gene L1 of the HPV using the primers MY09/11 in the platform of real time PCR is a sensitive and very quick method for the detection of the high risk genotypes (HPV 16/18). This method guarantees a detection test of 1 hour for the type-specific genome of the HPV of high risk 16/18, which could be implemented at the clinic as a quick method of monitoring.



### III. ANTECEDENTES

#### GENERALIDADES

Los virus del papiloma (HPV) son partículas pequeñas, carentes de envoltura, poseen cápsides icosaédricas de aproximadamente 5 nm de diámetro y su genoma es DNA de doble cadena. Los virus del papiloma se distribuyen ampliamente en el reino animal y presentan una gran especificidad de especie. Infechan tejidos epiteliales, provocando la aparición de condilomas.

1

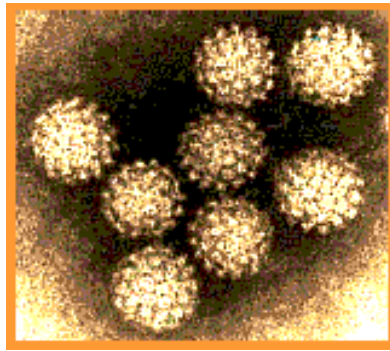


Figura 1. Muestra la imagen del Papilomavirus Humano, vista mediante Microscopía electrónica.

Los HPV's son agentes infecciosos comúnmente transmitidos por vía sexual, generalmente provocan infecciones transitorias y asintomáticas.

En la actualidad han sido identificados más de 100 tipos de virus del papiloma humano, los cuales han sido clasificados en dos grupos: 1) los que infectan piel; y 2) los que infectan epitelios mucosos. Dentro de cada uno de estos grupos encontramos virus de bajo y de alto riesgo, de acuerdo al daño que puedan causar, induciendo la proliferación de tumores malignos.<sup>2</sup>

Entre los tipos cutáneos están el, HPV-5 y el HPV-8 clasificados de alto riesgo, debido a que se asocian con el desarrollo de las epidermodisplasias

verruciformes. Estos se han detectado en gran porcentaje de cánceres de piel del melanoma, principalmente en pacientes inmuno-suprimidos. El HPV-6 y el HPV-11 de bajo riesgo, asociados a epitelios mucosos, causan verrugas genitales, mientras que las lesiones intraepiteliales escamosas las causan los HPV de alto riesgo que pueden progresar a un carcinoma invasor escamoso de la célula.

## EL HPV Y EL CÁNCER

En la actualidad se conoce con claridad la relación causal entre las infecciones persistentes por los genotipos de HPV de alto riesgo y el desarrollo del cáncer cérvico uterino.<sup>3</sup>

De los más de 100 genotipos de HPV conocidos, los siguientes son considerados de alto riesgo: 16, 18, 31, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 70, y de estos, los tipos 16, 18, 31 y 45 son considerados más importantes, debido a que están relacionados con aproximadamente el 80 % de todos los casos de cáncer cérvico uterino.<sup>4</sup> El HPV 16 es responsable de aproximadamente 50% de los carcinomas de las células escamosas, mientras que el HPV 18 es el causante de alrededor del 50% de los casos de adenocarcinomas.<sup>1</sup>

El riesgo de cáncer cervical depende del tipo de HPV, de la población. Siendo necesarios, tanto factores virales, como aspectos inmunológicos y genéticos

del hospedero, para el desarrollo de lesiones precancerosas y finalmente del cáncer cervical. <sup>5,6,7,8</sup>

Los virus del papiloma humano inician su ciclo vital infectando células basales del epitelio, una vez en el interior de estas células, el genoma vírico se replica, utilizando para ello la maquinaria de replicación celular, y se mantiene en estado episomal e improductivo, mientras continúa la diferenciación de las células basales. Durante la diferenciación de las células basales la proteína E2 del VPH participa en la replicación del genoma vírico y reprime la transcripción de los genes virales E6 y E7, implicados en el mecanismo de la carcinogénesis cervical <sup>2</sup> (Fig.2).

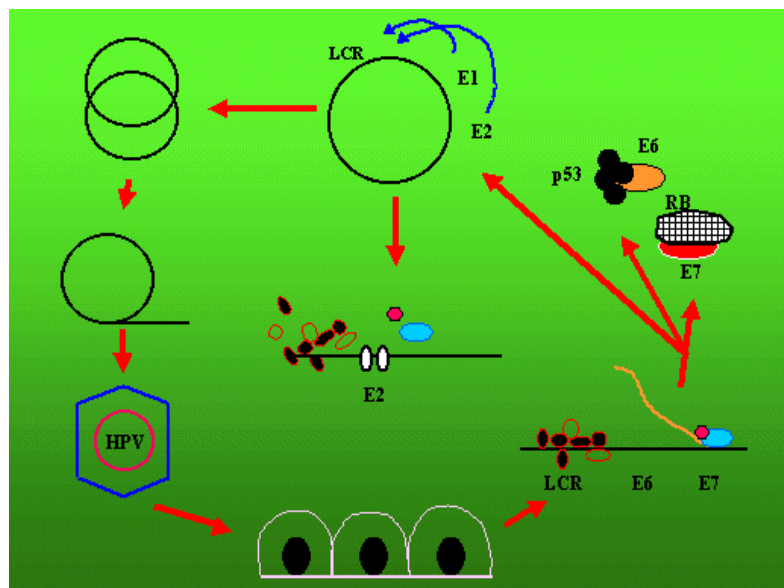


Figura 2. Mecanismos involucrados en la carcinogénesis del Papilomavirus Humano

## PERÍODO DE INCUBACIÓN:

El periodo de incubación es variable, por lo general de dos a tres meses, aunque puede ser de años. La mayoría de las infecciones transcurren sin lesiones aparentes y desaparecen sin dejar evidencias de la infección. Un porcentaje pequeño (5-15%) de las infecciones persisten al cabo del tiempo provocando lesiones que podrían evolucionar a lesiones precancerosas neoplasia intraepitelial cervical grado 3 (NIC 3) o cáncer en un periodo de los 10 a 12 años.<sup>4,9</sup>

En el caso de los HPV's de bajo riesgo la duración de la infección puede prolongarse hasta 4 meses y hasta de 8 meses en el caso de los HPV de alto riesgo, como el tipo 18. La infección con el HPV 16 puede durar más tiempo.<sup>2</sup>

## BIOLOGIA MOLECULAR DEL HPV

El genoma del virus del papiloma humano puede ser dividido en tres regiones (E,L y RLC): la región E (E= early), representa el 45% del genoma, que contiene 7 genes nombrados sucesivamente E1 a E7, están implicados en la replicación, la maduración, escape de los viriones y en la carcinogénesis celular; la región L (L= late), corresponde al 40% del genoma, contiene dos genes los cuales codifican dos tipos de capsómeros: el gen **L1** produce una proteína de 54 kd que se produce en mayor cantidad y la cual se encuentra muy conservada entre los diversos tipos de HPV , y el gen **L2** que produce una menor cantidad de proteína, esta es específica para cada tipo viral; y una tercera región llamada región de regulación corriente arriba (RLC) carente de

genes, pero rica en zonas de regulación; la cual corresponde al 15% del genoma viral, la cual contiene los promotores que inician la replicación y controlan la transcripción (ver figura 3).

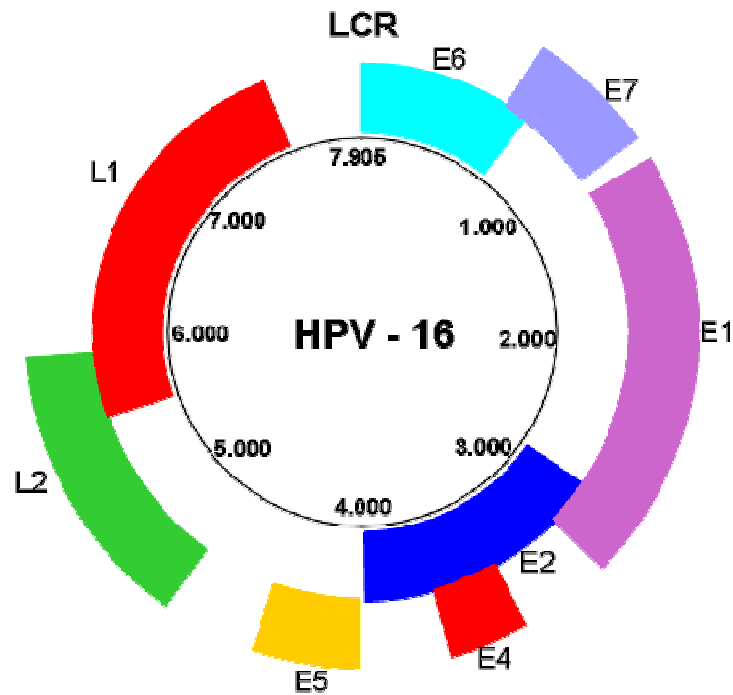


Figura 3. En la figura se muestra el Mapa genético del Papilomavirus tipo 16 con las posiciones de los genes.

Un evento importante en la carcinogénesis mediada por los HPV's de alto riesgo es la integración del genoma vírico en uno de los cromosomas celulares, la cual tiene como consecuencia la pérdida del gen E2. Circunstancia que permite que los oncogenes virales E6 y E7 se sobreexpresen. Las actividades de las proteínas E6 y E7, crean un ambiente celular capaz de sostener la replicación del DNA vírico y celular en queratinocitos diferenciados, provocando inestabilidad genética.<sup>2,10</sup>

La proteína E7 inactiva, promueve la degradación de la proteína supresora de tumor pRb, en ausencia de pRb, la proteína E2F un factor transcripcional implicado en la regulación del ciclo celular, promueve la síntesis del DNA. E7 también inhibe la función de la proteína p21<sup>CAF</sup>, una proteína que inhibe el crecimiento celular, generando condiciones favorables para la proliferación celular en ausencia de estímulos mitógenicos externos.

Estas señales son percibidas como contradictorias por las células, lo cual activa a la proteína p53, como mecanismo de defensa. Esto no ocurre así en presencia de la proteína oncogénica E6, cuya función consiste en promover la degradación de p53, impidiendo su actividad. La degradación de la proteína p53 no solo permite la supervivencia de las células alteradas sino que también contribuye a la inestabilidad genética de las células, ya que p53 es también una proteína encargada de vigilar la integridad del genoma.

Otra función importante de la proteína E6 es la activación transcripcional del gen de la telomerasa, enzima indispensable en el mantenimiento de los telomeros y por lo tanto de la capacidad proliferativa de las células. Los cambios celulares producidos por las actividades de las proteínas E6 y E7 en conjunto con cambios genéticos, pueden dar como resultado el desarrollo de cáncer cérvico uterino. <sup>2,10</sup>

Dentro del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), localizado en el cromosoma 6 se encuentra el HLA (human leukocyte antigens), comprende una familia de genes que controlan la respuesta inmune hacia agentes patógenos, aceptación o rechazo de trasplantes (de ahí el término histocompatibilidad) y vigilancia de tumores. La expresión de las moléculas de HLA se ve alterada de muchas maneras en las células cervicales cancerosas, varios alelos y haplotipos de clase II han sido descritos y asociados a susceptibilidad de cáncer cervical e infección por HPV.<sup>5</sup>

Se ha postulado que la respuesta inmunológica controla la infección por HPV en la mayoría de las mujeres, siendo así estas infecciones transitorias. Sin embargo, en algunos casos la infección puede ser persistente y llevar al desarrollo de lesiones precancerosas.<sup>11,12</sup>

## FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS AL HPV Y EL DESARROLLO DE CÁNCER CERVICOUTERINO

Solo una pequeña parte de las infecciones crónicas por HPV evolucionan de neoplasia intraepitelial cervical I (NIC I) a NIC II o NIC III y/o cáncer cervicouterino. Algunos factores importantes asociados con esta evolución hacia el cáncer son: conducta sexual, consumo de tabaco, mujeres con alto número de embarazos, sistema inmunológico deprimido, uso prolongado de anticonceptivos, desnutrición etc.<sup>13</sup>

## MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL HPV

Existen distintos métodos para la detección y tipificación del virus del HPV, la mayoría basados en la identificación del DNA viral y otras en RNA, como son:

### ❖ Captura de Híbridos

El método de captura de híbridos se fundamenta en el empleo de una mezcla de RNAs complementarios al DNA de la muestra, dirigidos para detectar distintos tipos de HPV, los filamentos del RNA y del DNA se enlazan y forman híbridos RNA:DNA. Si en la muestra sometida a prueba se encuentra alguna secuencia complementaria a la de los RNAs utilizados en la hibridación, la cual es medida en unidades relativas de luz (RLU), se tendrá un resultado positivo. La técnica presenta algunas limitaciones, como la detección de algunos tipos de HPV debido a hibridaciones inespecíficas; este es un problema común en muchas metodologías que utilizan RNAs en hibridaciones.<sup>14</sup>

### ❖ Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

A través de esta metodología se obtienen un número de copias elevado a partir de un segmento de ácido nucleico a estudiar. Utilizando este método es posible generar millones de copias de un segmento de DNA específico, las cuales se obtienen por medio de una repetición cíclica de tres etapas:

-Desnaturalización: este proceso se obtiene separando las cadenas de DNA con temperaturas elevadas, generando un molde de hebra simple.



-Alineamiento: en esta etapa ocurre una hibridación o unión de iniciadores a sus secuencias homólogas al DNA sustrato. Se unirán solamente a secuencias complementarias bajo condiciones específicas de temperatura.

-Polimerización o elongación: es la extensión en sentido 5'-3' del complejo iniciador-sustrato. Esto se obtiene con la utilización de la enzima Taq polimerasa la cual va incorporando los nucleótidos (dNTPs).

Las cadenas recién formadas son separadas de nuevo por el calor y comienza otro nuevo ciclo de copias. Estos ciclos se repiten hasta que se obtiene el número de copias deseado. <sup>15,16</sup>

La técnica de amplificación por PCR también se utiliza en la detección del HPV. Mediante la utilización de oligonucleótidos dirigidos contra secuencias variables, la detección e identificación de genotipos de HPV individuales en un solo paso. En algunas técnicas de PCR se prefiere la utilización de oligonucleótidos específicos para regiones conservadas como por ejemplo para el gen L1, esto permite detectar en una primera etapa la presencia de cualquier tipo de HPV en las muestras estudiadas. Si resulta positivo, para identificar a los genotipos presentes el DNA amplificado puede secuenciarse o ser identificado en hibridaciones de tipo Dot- Blot. <sup>14</sup>

#### ❖ MassARRAY

La técnica de MassARRAY permite la detección del HPV en pacientes con cáncer cérvico uterino, a partir de sangre periférica o suero sanguíneo. Es muy sensible y detecta la presencia de un número extremadamente pequeño de moléculas de DNA vírico.

La técnica de MassArray implica un proceso de tres pasos como sigue: PCR competitivo en tiempo real, extensión de primers, y separación de productos en una matriz-cargada en un chip de sílice para detectar moléculas iniciales (MALDI-TOF MS).<sup>17</sup>

#### ❖ Microarreglos de DNA (MICROARRAYS)

Los microarreglos de DNA del HPV tienen un alto grado de especificidad y reproducibilidad. Para superar las limitaciones existentes de la detección de HPV y de las metodologías de geno-tipificación disponibles, se propuso una técnica mejorada basada en la PCR y el microarreglo de HPV en la práctica clínica. Aunque se sabe que el método de PCR es más sensible para la detección de infección por HPV, tiene algunas desventajas, como la obtención de falsos-positivos. En la hibridación de DNA de HPV en microarreglos esto no es observado. Los microarreglos son una tecnología adaptada para la geno-tipificación de HPV, siendo una herramienta para el diagnóstico clínico y grandes estudios epidemiológicos.<sup>18,19</sup>

## ❖ CITOLOGIA

La [citología](#) vaginal o Papanicolau es una prueba en la que se analizan células mediante un estudio [anatomopatológico](#). Consiste en la toma de una muestra de células epiteliales que recubren el cuello del [útero](#) para su posterior estudio con microscopio, y así poder observar tempranamente cambios en la forma de las células.

La citología cervical o cérvico vaginal ha contribuido de una manera eficaz a la erradicación parcial del cáncer cervical y todavía es considerado como el mejor sistema de detección temprana de cáncer de todos los métodos existentes. Los resultados de esta prueba pueden mejorarse notablemente con la incorporación de nuevos métodos basados en biología molecular o inmunocitoquímica.<sup>11,20</sup>

## ❖ COLPOSCOPIA

La colposcopia es un método diagnóstico que se realiza en Ginecología. El colposcopio está constituido esquemáticamente por una lupa de distancia focal larga y una fuente luminosa. Antes de iniciar el estudio, es necesaria la aplicación de ácido acético al 3 ó 5% para ayudar a discriminar el epitelio normal del anormal. El ácido acético es aplicado directamente en el cérvix con torundas de algodón. En los epitelios dañados hay un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, lo que permite que el ácido penetre y cause aglutinación de proteínas, fenómeno responsable del color blanco que toma el epitelio enfermo. El uso del colposcopio permite el estudio del tracto genital femenino inferior, no solo de lesiones de cuello uterino (benignas, precancerosas o cancerosas), se introduce el colposcopio por la vagina de la

mujer y permite visualizar su aspecto interior, alguna anomalía macroscópica (a simple vista) y la toma de muestras para posterior análisis mediante el microscopio. Se introduce una torunda de algodón o una pequeña espátula a través del espéculo para la toma de muestra ya sea de secreciones, de células de la vagina o del cuello uterino, también se pueden estudiar los genitales masculinos. <sup>11,20</sup>

## TRATAMIENTO DEL CANCER CERVICO-UTERINO

El tratamiento aplicado a una mujer enferma con cáncer de cérvix depende de las características histológicas, del tamaño y de la etapa en la que se encuentre el tumor, también se consideran otros factores de riesgo, durante los procedimientos quirúrgicos o de irradiación. Un punto importante, es que algunos tratamientos pueden provocar infertilidad. <sup>21</sup>

-Procedimientos quirúrgicos: los cánceres microinvasivos de menos de 3 mm suelen retirarse mediante biopsias. Los cánceres invasivos en estadios tempranos son eliminados mediante histerectomía radical, radiaciones de alta energía (18 mV) o colocando implantes llenos de <sup>192</sup>Ir.

Actualmente se estudia la utilización de agentes antivirales y se intenta desarrollar vacunas profilácticas y terapéuticas para controlar y prevenir el cáncer cérvico-uterino. <sup>10,22</sup>

Peng y colaboradores, en el 2004 diseñaron una vacuna de DNA que codifica la calreticulina (CRT) unida a la proteína E6 (CRT/ E6) y la utilizaron para inmunizar ratones. Estos animales desarrollaron fuertes respuestas

inmunológicas de tipo celular, y resultaron protegidos contra la línea tumoral TC1, que expresa la proteína E6. <sup>10,23</sup>

Por su parte, Yuan y colaboradores en el 2005 desarrollaron una vacuna producida en *Escherichia coli*, formada por la fusión de la proteína L1 de HPV y la proteína GST. Esta vacuna protegió a un modelo canino contra dosis altas del virus oral del papiloma canino. <sup>24</sup>

## PCR EN TIEMPO REAL

También denominada PCR cuantitativa, se basa en detectar la fluorescencia emitida cuando se genera el fragmento específico durante la amplificación. Durante la amplificación se puede medir la cantidad de DNA sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de DNA copiado en cada ciclo.

En cambio la PCR de punto final utiliza geles de agarosa para medir el producto final de la reacción, limitando así la medición de la amplificación a un tiempo determinado (2-3hrs) hasta que termine dicho proceso, basándose los resultados en una discriminación por tamaños (pares de bases) en los geles, que es inexacta en la cantidad, mostrando una baja sensibilidad.

## FASES DE LA PCR

Es importante conocer el funcionamiento de una reacción de PCR, ya que esto nos permitirá entender lo que sucede durante la reacción y entender sus limitantes.

Su funcionamiento básico se divide en 3 fases:

- 1) Exponencial: es donde el producto se esta acumulando (amplificando) en una forma exponencial en cada ciclo transcurrido, donde se asume que hay una eficacia del 100% en la reacción.
- 2) Lineal: donde se están consumiendo los componentes de la reacción, presentando una alta variabilidad.
- 3) Meseta o punto final: la reacción ha terminado, concluye la fabricación de los productos los cuales pueden llegar a degradarse si transcurre mas tiempo. Este es el resultado que se detecta mediante los geles de azarosa (figura 4) (7,8,11,23).

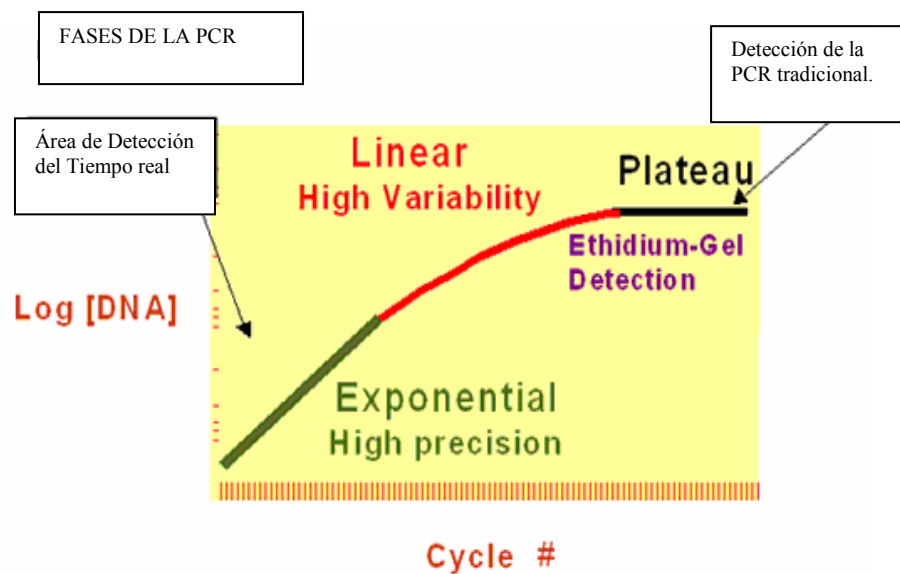


Fig. 4. Fases de la PCR

El instrumento de LightCycler de Roche Diagnostics utiliza varios canales de detección para supervisar la amplificación de los productos de PCR en tiempo real. El sistema es tan flexible que tiene varios formatos de análisis de fluorescencia y utiliza una amplia gama de moléculas fluorescentes que pueden ser: agentes intercalantes y sondas específicas como son: SYBR Green

(medida en 530nm), sondas de hibridación, sondas de hidrólisis, molecular beacons, sondas FRET. <sup>15,27,28</sup>

La molécula mas utilizada en PCR a tiempo real es el SYBR Green I. El incremento de DNA en cada ciclo se refleja en el aumento de la fluorescencia emitida, esta molécula fluorescente se intercala en la doble cadena de DNA, emitiendo su fluorescencia al desnaturalizarse el DNA.

El inconveniente de los agentes intercalantes es su baja especificidad, debido a que se unen de manera indistinta a productos generados inespecíficamente o a dímeros de cebadores. Para esto es recomendable iniciar la reacción de síntesis de DNA a temperaturas elevadas (más de 95°) lo cual disminuye de forma notable el riesgo de amplificaciones inespecíficas. <sup>15,28</sup>

Opciones de Programas del Equipo:

- Amplificación y detección de DNA o RNA diana en la muestra
- PCR múltiple
- Cuantificación del DNA o RNA diana en la muestra.
- Análisis de Curvas de disociación (curvas-melting)

#### CURVA DE DESNATURALIZACIÓN (MELTING)

El análisis de las curvas-melting es una herramienta apropiada para discriminar entre productos específicos y los no específicos, por eso deben ser incluidos siempre en el programa. Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados. Se determina la temperatura de

desnaturalización ( $T_m$ ) de los amplicones para comprobar su especificidad. Cada producto de DNA (doble cadena) tiene una  $T_m$  específica. La  $T_m$  es aquella en la cual el 50% del DNA esta en forma sencilla (cadena sencilla). También es posible el análisis de mutaciones puntuales (Fig.5).

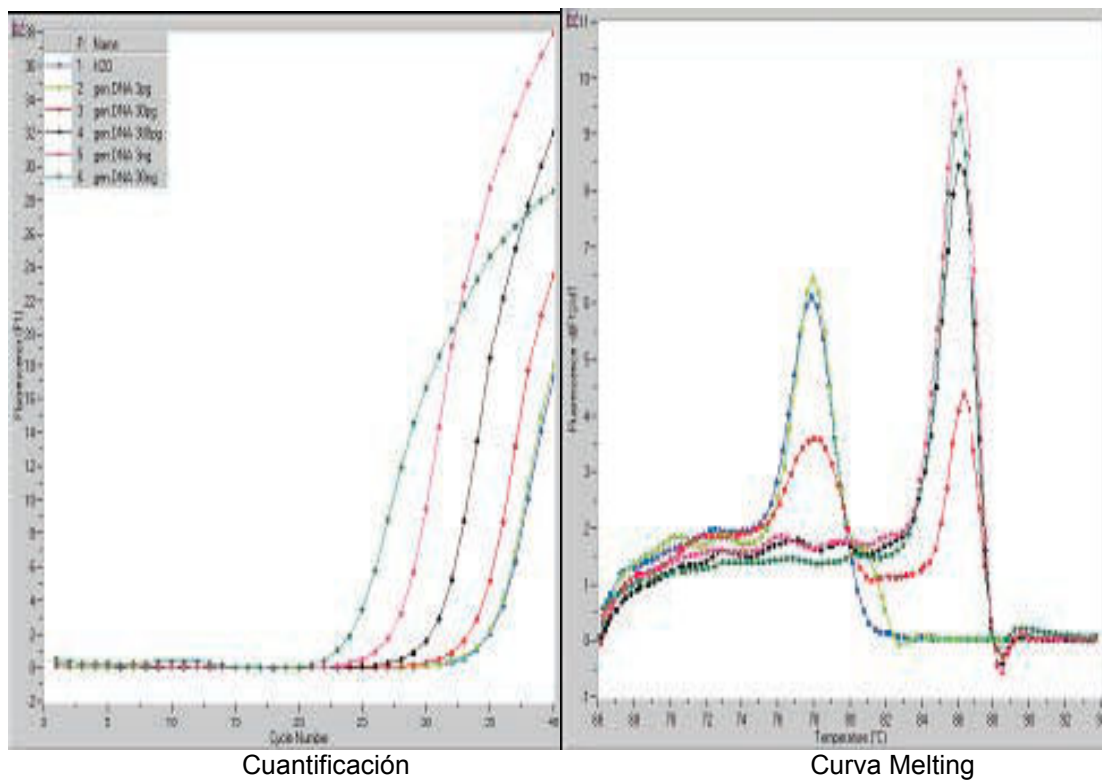


Fig. 5. Análisis de Curvas Melting

La PCR a tiempo real combinada con los nuevos sistemas automáticos para la purificación de ácidos nucleicos, ofrece una plataforma ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para la identificación y cuantificación de los agentes infecciosos de interés clínico. Debido a sus indudables ventajas, como la facilidad de empleo, la mayor rapidez o el menor riesgo de contaminación, la PCR a tiempo real, irá reemplazando la PCR convencional y se extenderá a un amplio abanico de aplicaciones.<sup>15,29</sup>



## IMPORTANCIA EN EL DIAGNOSTICO CLINICO

En los últimos años se han desarrollado innumerables aplicaciones de la PCR en tiempo real en el diagnóstico clínico.

La plataforma es ideal para el desarrollo de una gran variedad de pruebas moleculares para identificar agentes infecciosos como es el caso de muchos virus (familia de los Herpesvirus, virus respiratorios, enterovirus, virus JC, virus BK, virus del SARS etc.), de bacterias que no crecen en medios de cultivo como *Tropheryma wippelli*, *Bordetella pertussis*, *Bartonella* o muy lentamente como *Mycobacterium tuberculosis*. También, de micosis invasivas especialmente por *Aspergillus ssp*, de infecciones parasitarias como las ocasionadas por *Toxoplasma gondii* (11,44). Existen Kits para el diagnóstico de los agentes infecciosos de mayor interés clínico mediante esta técnica como son: VIH, VHB, VHC, citomegalovirus. <sup>15,29</sup>

Otro campo potencial de aplicación de la PCR a tiempo real es la identificación de organismos fácilmente cultivables, por ejemplo, *Streptococcus* del grupo B (*S. agalactiae*) en frotis vaginales (riesgo de infección neonatal), ya que su aislamiento mediante cultivo es de 1-2 días mientras que con la PCR en tiempo real se puede llevar a cabo en 30 minutos. Detección y Tipificación de HPV en raspados cervicales, biopsias, asociación con otro tipo de cánceres, marcadores para cáncer de próstata, etc. <sup>10,31</sup>

En otros casos, como la sepsis, la supervivencia del enfermo puede depender de un diagnóstico a tiempo del agente causal, que permita establecer el

tratamiento antibiótico específico en etapas tempranas del proceso. La PCR en tiempo real no reemplaza al hemocultivo, ya que la sepsis puede estar ocasionada por una variedad de microorganismos.<sup>15,31</sup>

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En la actualidad se conoce con claridad la relación causal entre las infecciones persistentes por los genotipos de HPV de alto riesgo (HPV 16/18) y el desarrollo del cáncer cérvico uterino, siendo este la 2<sup>a</sup> causa de muerte. Debido a que los HPV son los agentes infecciosos comúnmente transmitidos por vía sexual. Se hace conveniente y útil implementar una metodología de detección y tipificación del HPV de alto riesgo que sea rápida y sensible mediante la aplicación de instrumentos y tecnologías modernas como la PCR en tiempo real.

#### **V. HIPOTESIS**

La implementación de la PCR en tiempo real en la detección y tipificación del HPV, nos permitirá determinar de forma rápida y con alta sensibilidad, los genotipos de alto riesgo (HPV 16/18) presentes en la muestras.

## **VI. OBJETIVOS GENERALES**

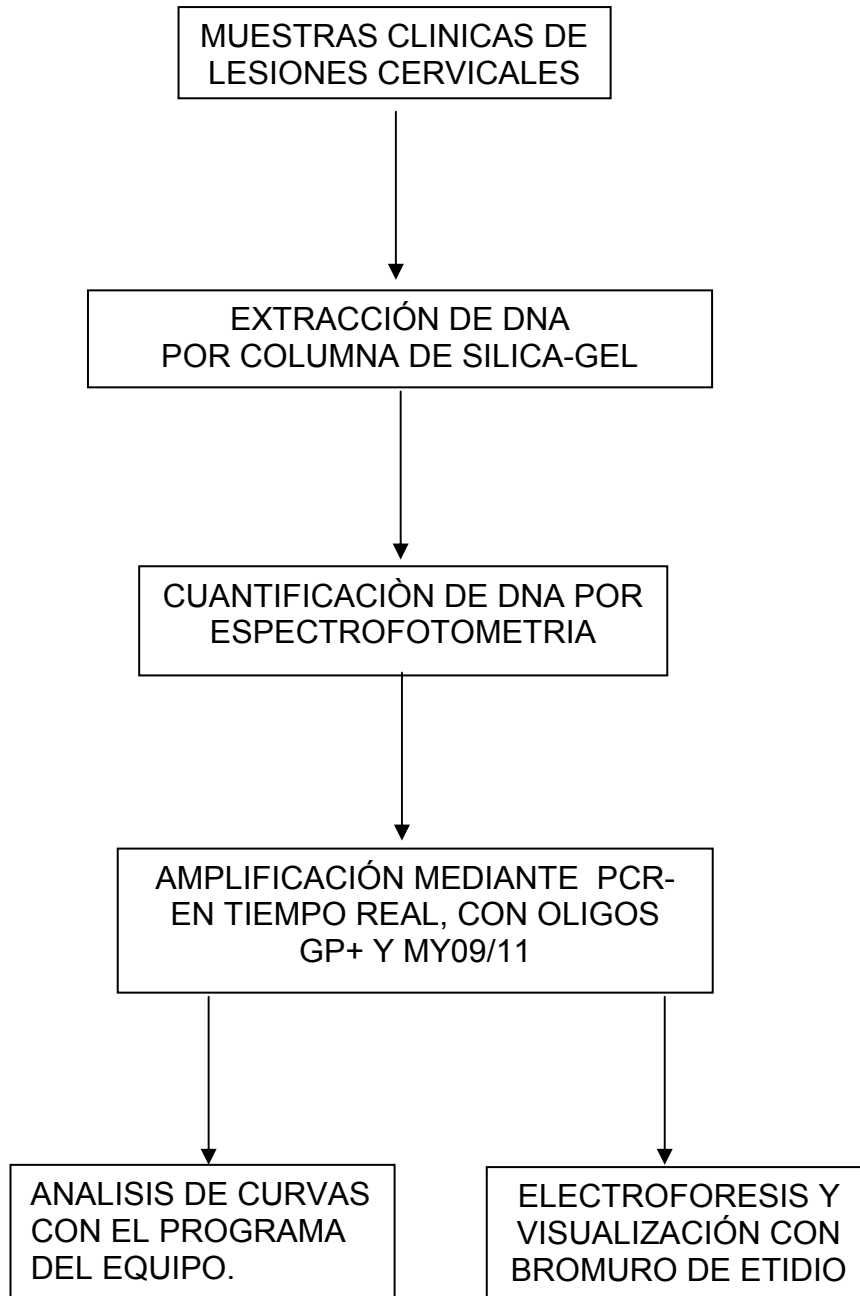
Desarrollar un protocolo rápido y preciso basado en la PCR en tiempo real para la detección y tipificación de HPV de alto riesgo (HPV 16/18) a partir de biopsias de cepillados cervicales.

## **VII. OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Obtención de muestras clínicas de cepillado cervical de mujeres con diferentes lesiones cervicales.
2. Extracción, purificación y valoración del DNA de las muestras clínicas de cepillado cervical.
3. Purificar DNA de líneas celulares infectadas con HPV (Hela y Caski) como controles positivos.
4. Diseñar y Estandarizar el método a seguir utilizando los oligos GP+ y MY09/11 para PCR en tiempo real.

## VIII. MATERIAL Y METODOS

### DIAGRAMA DE FLUJO



## OBTENCIÓN DE MUESTRA

1. Eliminar el moco sobrante del orificio cervical y endocervix circundante utilizando una torunda de algodón. Desechar la torunda.
2. Insertar el cepillo en el orificio cervical a una profundidad de 1 a 1.5 cm hasta que las cerdas externas mas largas del cepillo toquen el ectocervix.
3. No debe insertarse el cepillo completo en el canal cervical.
4. Girar el cepillo tres veces en sentido contrario del reloj.
5. Obtener la muestra para DNA antes de aplicar ácido acético o iodo si es que se va a realizar una colposcopia
6. Colocar el cepillo dentro del tubo de transporte que contiene la solución DNAlater. Sostenga el mango del cepillo y córtelo en la zona premarcada.
7. Rotular el tubo con los datos necesarios.

## EXTRACCIÓN DE DNA

1. Tomar 100 $\mu$ L de la muestra en un tubo, centrifugar durante 5min a 1000 rpm y resuspender en 200  $\mu$ L de PBS.
2. Adicionar 4  $\mu$ L de RNase A e incubar 2 min a temperatura ambiente.
3. Adicionar 20  $\mu$ L de Proteinaza K y 200  $\mu$ L del Buffer AL, mezclar la muestra durante 5 a 10seg. Incubar 10min a 70°
4. Agregar 200  $\mu$ L de etanol absoluto y mezclar.

5. Pipetear la mezcla por la columna de silica-gel y coleccionar en un tubo de 2mL. Centrifugar a 8000 rpm durante 1 min.
6. Lavar la columna con 500  $\mu$ L de Buffer AW1 y centrifugar durante 1min a 8000 rpm.
7. Cambiar la columna a un tubo coleccionador nuevo y adicionar 500  $\mu$ L del Buffer AW2 y centrifugar por 3 min a 8000 rpm.
8. Poner la columna de silica-gel en un tubo 1.5mL de microcentrifuga y adicional 100  $\mu$ L de Agua libre de sales, directamente a la membrana DNeasy. Incubar 1Hrs a 4° y centrifugar 3 min a 8000 rpm.
9. Guardar la muestra a -4°C.

#### CUANTIFICACIÓN DEL DNA

1. Descongelar la muestra de extracción a temperatura ambiente
2. Mezclar por 10 segundos.
3. Realizar la dilución 1:50 de cada muestra con agua inyectable.
4. Calibrar el equipo con muestra blanco.
5. Leer las diluciones en el Espectrofotómetro.

#### PCR EN TIEMPO REAL

1. Limpiar la campana e irradiar con luz UV durante 5min
2. Preparar la mezcla de reacción con un volumen final de 10  $\mu$ l
3. Vaciar a cada capilar
4. Tapar el capilar control

5. Sacar del refrigerador el DNA problema y aplicar a cada capilar
6. Tapar los capilares
7. Centrifugar 5-10 seg los capilares
8. Poner los capilares en el Termociclador de PCR-tiempo real y programar el equipo (LightCycler de Roche Diagnostics 1.2)

## DISEÑO DE LOS INICIADORES

| <b>Primers</b> |                            | <b>Long<br/>en pb</b> | <b>GC(%)</b> | <b>Tm(°C)</b> |
|----------------|----------------------------|-----------------------|--------------|---------------|
| GP5+           | GATCCAGAAGGTACCGACGGGAGG   | 24                    | 47.3         | 48            |
| GP6+           | CCACTTCAGTAAGCAAACAATC     | 20                    | 50.0         | 44            |
| MY09           | CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC | 20                    |              |               |
| MY11           | GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG | 20                    |              |               |

## TIPOS DE HPV QUE IDENTIFICAN LOS OLIGOS

Oligos GP's: HPV 6b, 11, 12, 16,18, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 61, 66.

Oligos MY: HPV 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 52, 53, 55, 56, 58, 59.



## IX. RESULTADOS

### CUANTIFICACIÓN DE MUESTRAS

| <b>MUESTRA</b> | <b>Abs 260</b> | <b>Abs280</b> | <b>ng/μl</b> | <b>Rel 260/280</b> |
|----------------|----------------|---------------|--------------|--------------------|
| H1             | 0.100          | 0.066         | 250          | 1.021              |
| H2             | 0.120          | 0.02          | 30           | 1.024              |
| H4             | 0.250          | 0.227         | 645          | 1.018              |
| H5             | 0.107          | 0.087         | 267          | 1.320              |
| H7             | 0.047          | 0.031         | 117.5        | 1.410              |
| H8             | 0.021          | 0.007         | 52.5         | 1.024              |
| H9             | 0.193          | 0.168         | 482.5        | 1.020              |
| H10            | 0.040          | 0.030         | 100          | 1.023              |
| H12            | 0.010          | 0.006         | 45           | 1.025              |
| H13            | 0.130          | 0.117         | 345          | 1.210              |
| H14            | 0.184          | 0.139         | 460          | 1.120              |
| H15            | 0.055          | 0.025         | 137          | 1.028              |
| H16            | 0.173          | 0.143         | 482.5        | 1.015              |
| H18            | 0.404          | 0.283         | 1010.0       | 1.421              |
| H19            | 0.032          | 0.021         | 80           | 1.210              |
| H20            | 0.022          | 0.016         | 55           | 1.203              |
| H21            | 0.462          | 0.321         | 1155.0       | 1.305              |
| H22            | 0.079          | 0.053         | 197.50       | 1.181              |
| H23            | 0.032          | 0.023         | 80           | 1.770              |
| H24            | 0.054          | 0.046         | 135          | 1.302              |
| H25            | 0.186          | 0.119         | 465          | 1.021              |
| H26            | 0.720          | 0.462         | 1800         | 1.024              |
| H27            | 0.088          | 0.058         | 220          | 1.018              |
| H28            | 1.331          | 1.178         | 1800         | 1.022              |
| H29            | 1.442          | 1.221         | 3605.0       | 1.024              |
| H30            | 1.884          | 1.505         | 4710.0       | 1.020              |
| H31            | 1.164          | 1.163         | 2910.0       | 0.942              |
| H32            | 0.738          | 0.819         | 1845         | 0.977              |
| H33            | 0.785          | 0.810         | 1962.5       | 1.003              |
| H34            | 0.506          | 0.301         | 1265.0       | 1.022              |
| H36            | 0.101          | 0.067         | 232.5        | 1.154              |
| H37            | 0.265          | 0.173         | 662.5        | 1.587              |
| H38            | 0.371          | 0.302         | 927.5        | 1.663              |
| H39            | 0.347          | 0.197         | 867.5        | 1.324              |
| H40            | 0.549          | 0.374         | 1365.0       | 1.298              |
| H41            | 0.105          | 0.072         | 262.5        | 1.055              |
| H42            | 0.247          | 0.209         | 617.5        | 1.061              |
| H43            | 0.064          | 0.045         | 160          | 1.001              |
| H44            | 0.149          | 0.086         | 232.5        | 1.312              |

| <b>MUESTRA</b> | <b>Abs 260</b> | <b>Abs280</b> | <b>ng/<math>\mu</math>l</b> | <b>Rel 260/280</b> |
|----------------|----------------|---------------|-----------------------------|--------------------|
| H45            | 0.105          | 0.084         | 262.5                       | 1.288              |
| H46            | 0.74           | 0.589         | 1850.0                      | 1.421              |
| H47            | 0.362          | 0.273         | 905                         | 1.022              |
| H48            | 0.520          | 0.310         | 1300.0                      | 1.035              |
| H49            | 0.396          | 0.238         | 990.0                       | 1.011              |
| H50            | 0.191          | 0.114         | 477.5                       | 1.079              |
| H51            | 0.043          | 0.008         | 107.5                       | 1.084              |
| H56            | 0.914          | 0.589         | 2285.0                      | 1.066              |
| H57            | 0.197          | 0.109         | 492.5                       | 1.045              |
| H60            | 0.668          | 0.666         | 1670.0                      | 1.247              |
| H63            | 0.445          | 0.262         | 1112.5                      | 1.611              |
| H71            | 0.152          | 0.066         | 380                         | 1.314              |
| H74            | 1.189          | 0.630         | 2972.5                      | 1.044              |
| H75            | 0.256          | 0.137         | 640                         | 1.510              |
| H76            | 0.359          | 0.153         | 897.5                       | 1.052              |
| H80            | 0.222          | 0.133         | 555                         | 1.154              |
| H86            | 1.041          | 0.699         | 2602.5                      | 1.011              |

Tabla 5. Cuantificación de Muestras.

Se obtuvieron 100 muestras de cepillado cervical, de las cuales 86 se ocuparon para trabajar en este protocolo y 14 restantes presentaron el DNA degradado, por lo cual no fueron incluidas en el estudio.

MEZCLA DE REACCION PARA PCR-TIEMPO REAL PARA ESTANDARIZAR  
 LA METODOLOGÍA

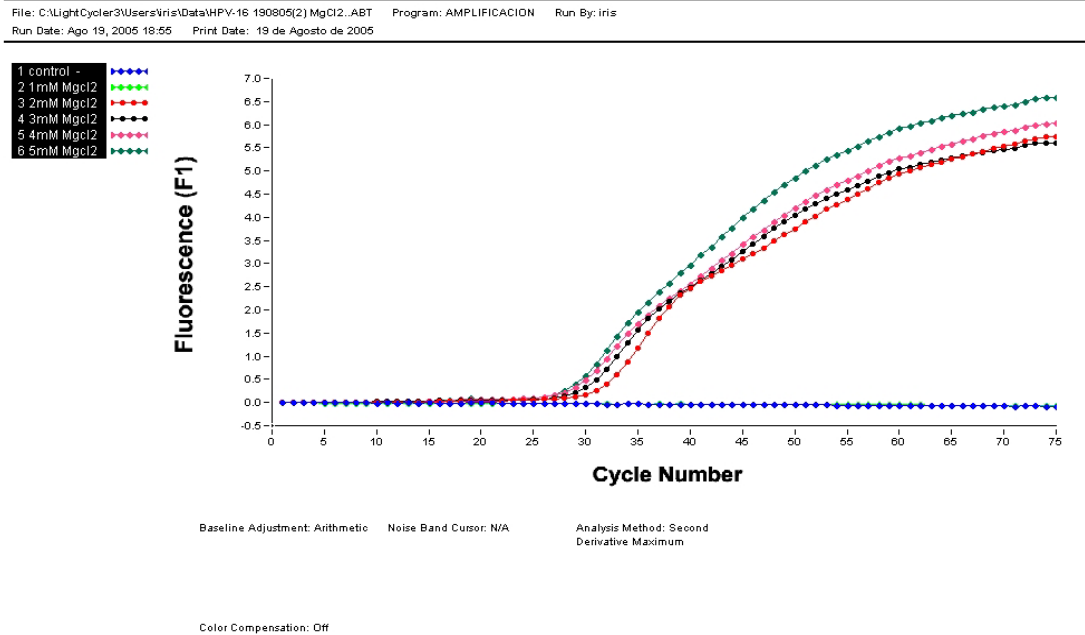
Tabla 1. Curva de MgCl<sub>2</sub>

| <b>REACTIVO</b>   | <b>1mM</b> | <b>2mM</b>    | <b>3mM</b>    | <b>4mM</b>    | <b>5mM</b>    | <b>C (-)</b> |
|-------------------|------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| H <sub>2</sub> O  | 6 µl       | 5.6 µl        | 5.2 µl        | 4.8 µl        | 4.4 µl        | 8 µl         |
| MgCl <sub>2</sub> | -----      | <b>0.4 µl</b> | <b>0.8 µl</b> | <b>1.2 µl</b> | <b>1.6 µl</b> | -----        |
| Primer 1          | 0.5 µl     | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl       |
| Primer 2          | 0.5 µl     | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl       |
| Mix Syber         | 1µl        | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl         |
| DNA prob          | 250ng      | 250ng         | 250ng         | 250ng         | 250ng         | -----        |

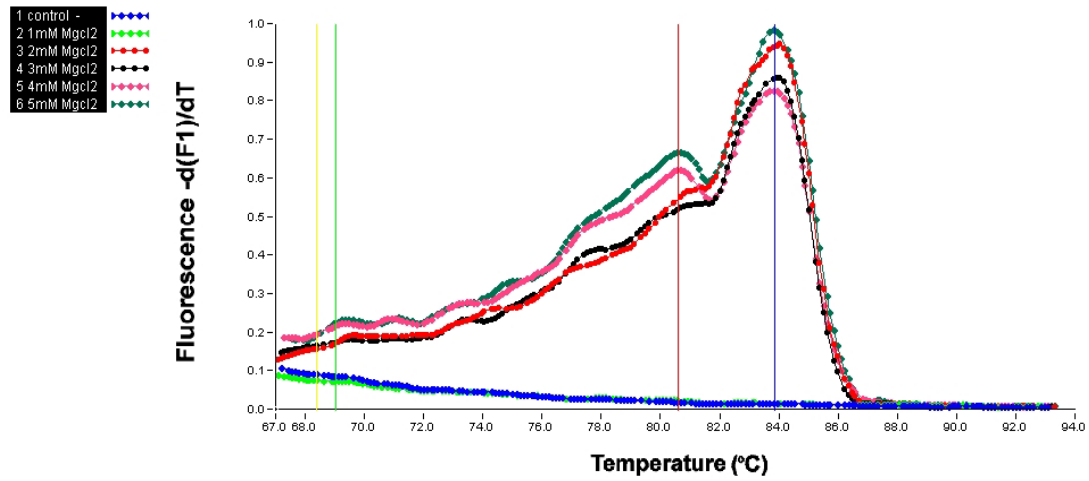
Condiciones y concentraciones de MgCl<sub>2</sub> que contiene cada capilar. Con esta prueba se determinó la concentración ideal de MgCl<sub>2</sub> para la metodología.

Marcadas con negrillas la variación en las concentraciones.

Curva de MgCl<sub>2</sub>

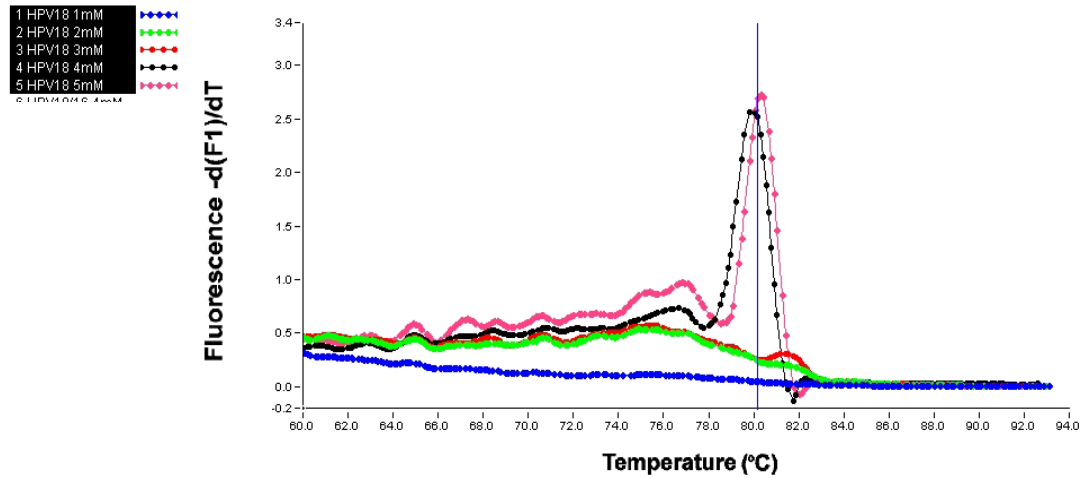


File: C:\LightCycler3\Users\Iris\Data\HPV-16\_190805(2)\MgCl2..ABT Program: MELTING CURVE Run By: Iris  
 Run Date: Ago 19, 2005 18:55 Print Date: 19 de Agosto de 2005



Digital Filter: Enabled Calculation Method: Polynomial  
 Degrees to Average: 4.0 Red cursor Tm = 80.6031 Yellow cursor Tm = 68.3745 Green cursor Tm = 69.0308  
 Color Compensation: Off Blue cursor Tm = 83.8789

File: C:\LightCycler3\Users\Administrator\Data\viria2-mgcl2-220503.ABT Program: MELTING CURVE Run By: Administrator  
 Run Date: May 22, 2003 19:27 Print Date: 12 de Octubre de 2006



Digital Filter: Enabled Calculation Method: Polynomial  
 Degrees to Average: 4.0 Red cursor Tm = 53.1492 Yellow cursor Tm = 54.1735 Green cursor Tm = 55.1977  
 Color Compensation: Off Blue cursor Tm = 80.1838

Fig. 6,7,8. Curva de estandarización de MgCl<sub>2</sub>.

La figura 6 nos muestra el proceso de amplificación de la muestra de DNA (control), en cada ciclo transcurrido. La figura 7 muestra el resultado de la curva de desnaturalización (curva-melting) que nos proporciona la Tm específica para dicho producto.

Las curvas son pruebas de estandarización del método, mediante las cuales se determina la concentración óptima de  $MgCl_2$ , primers y DNA a la cual el producto tiene un mejor comportamiento durante el proceso. Ocupándose un control (+) de HPV 16 y 18 respectivamente, para estandarizar el método.

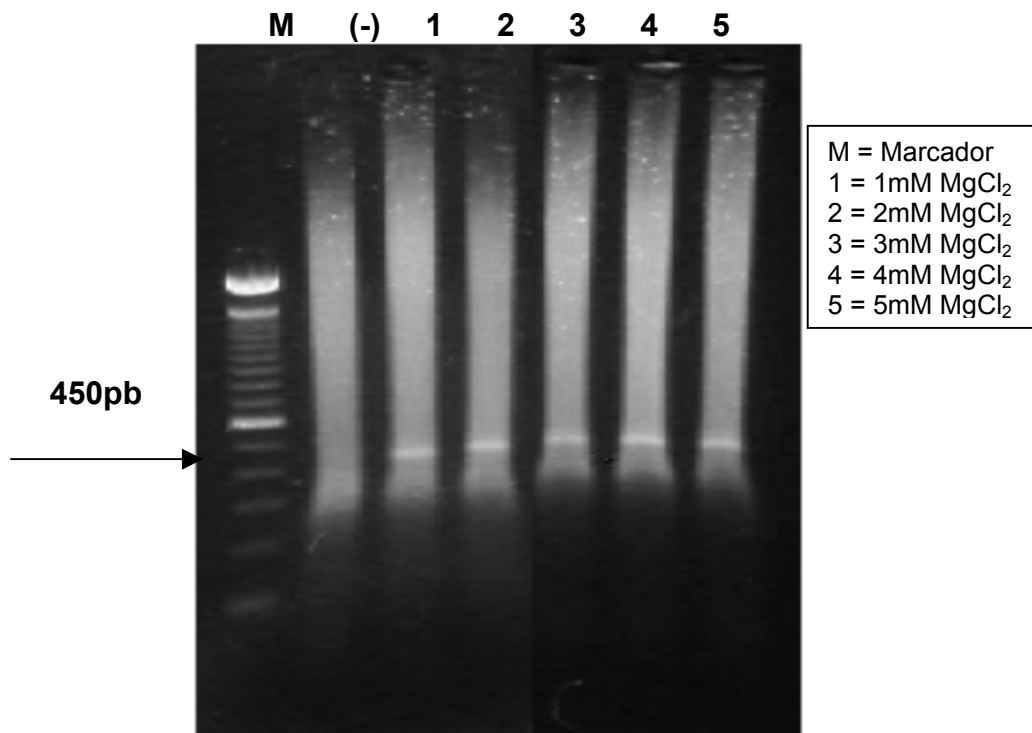


Fig. 9. Amplificación del producto de 450pb

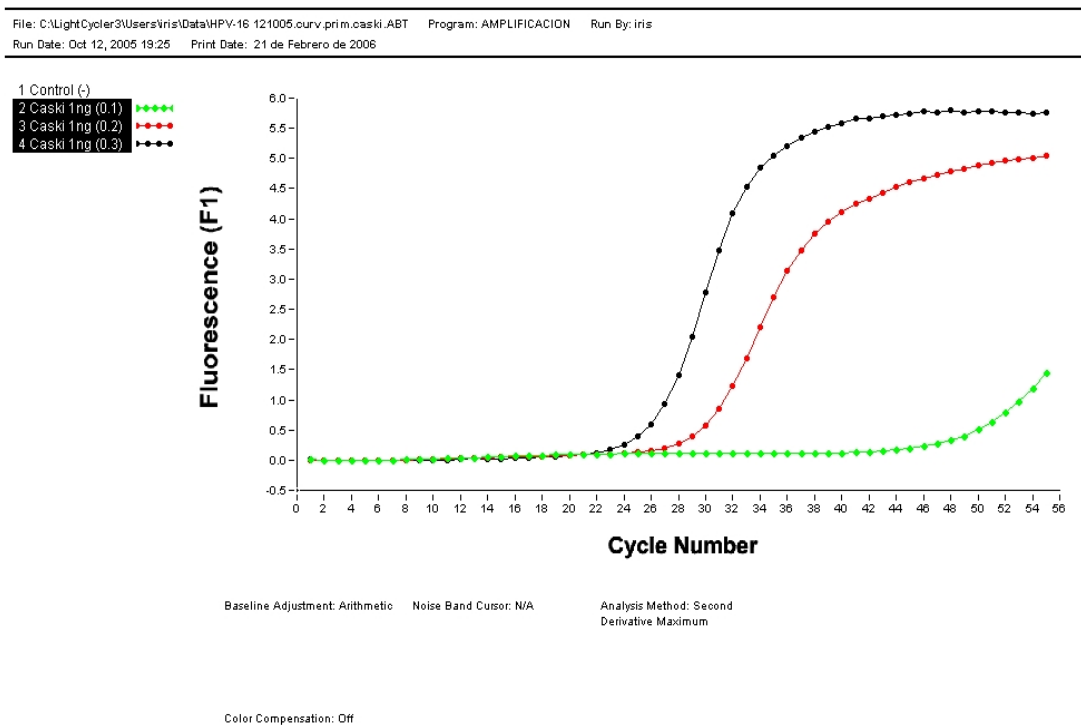
Se corrió un gel de agarosa al 2%, para comprobar que los productos de reacción amplificados y observados en las curvas emitidas por el equipo, sean los esperados. El producto esperado es de 450pb, usando un marcador de 100pb.

Tabla 2. Curva de Primers GP's

| <b>REACTIVO</b>   | <b>Tubo 1</b> | <b>Tubo 2</b> | <b>Tubo 3</b> | <b>Tubo 4</b> | <b>Tubo 5</b> | <b>C (-)</b>  |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| H <sub>2</sub> O  | 4.4 µl        | 4.6 µl        | 4.8 µl        | 5 µl          | 5.2 µl        | 6.4 µl        |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.6 µl        | 1.6 µl        | 1.6 µl        | 1.6 µl        | 1.6 µl        | 1.6 µl        |
| Primer 1          | <b>0.5 µl</b> | <b>0.4 µl</b> | <b>0.3 µl</b> | <b>0.2 µl</b> | <b>0.1 µl</b> | <b>0.5 µl</b> |
| Primer 2          | <b>0.5 µl</b> | <b>0.4 µl</b> | <b>0.3 µl</b> | <b>0.2 µl</b> | <b>0.1 µl</b> | <b>0.5 µl</b> |
| Mix Syber         | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl          |
| DNA prob          | 200ng         | 200ng         | 200ng         | 200ng         | 200ng         | -----         |

Curva de concentraciones de primer, mediante la cual se determinó la concentración ideal para la metodología que se quiere implementar.

Curva de Primers GP's



File: C:\LightCycler3\Users\iris1\Data\HPV-16\_121005.curv.prim.caski.ABT Program: MELTING CURVE Run By: iris  
Run Date: Oct 12, 2005 19:25 Print Date: 21 de Febrero de 2006

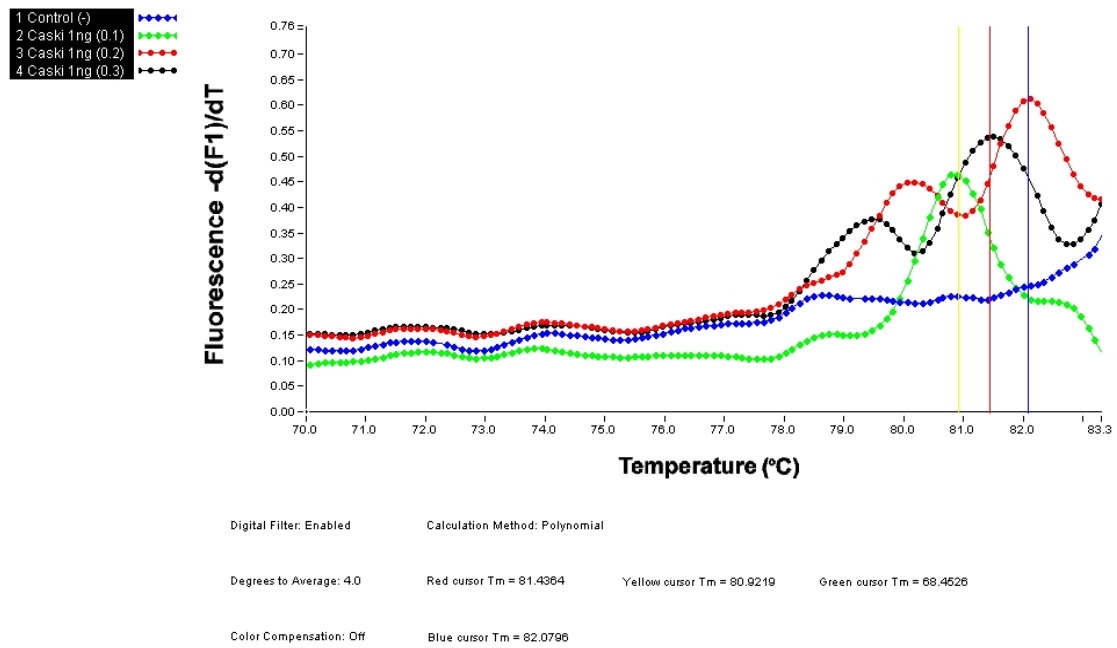


Fig. 10 y 11. Curva de Estandarización de primers

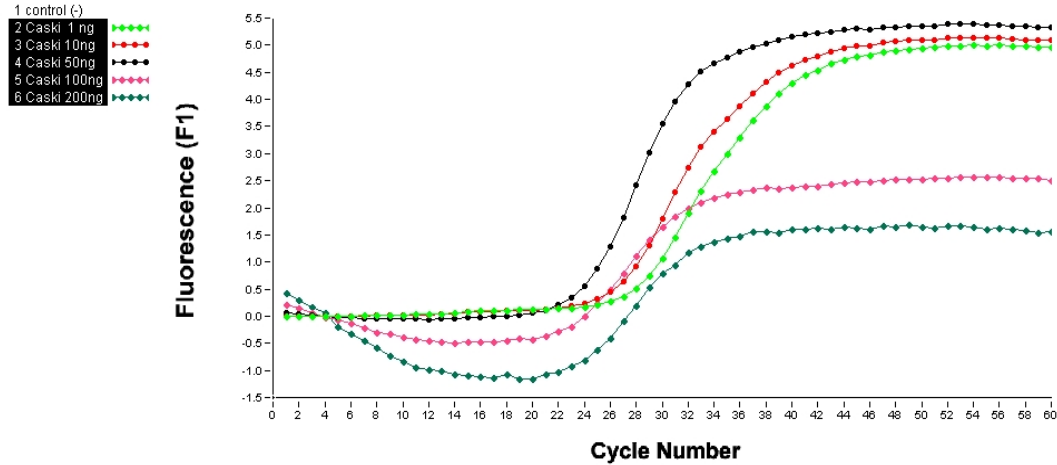
Tabla 3. Curva de DNA

| <b>REACTIVO</b>   | <b>Tubo 1</b> | <b>Tubo 2</b> | <b>Tubo 3</b> | <b>Tubo 4</b> | <b>Tubo 5</b> | <b>C (-)</b> |
|-------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| H <sub>2</sub> O  | 6 µl          | 5.6µl         | 5.2 µl        | 4.8 µl        | 4.4 µl        | 8 µl         |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.6 µl        | 1.6 µl        | 1.6 µl        | 1.6 µl        | 1.6 µl        | 1.6 µl       |
| Primer 1          | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl       |
| Primer 2          | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl        | 0.5 µl       |
| Mix Syber         | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl          | 1 µl         |
| DNA prob          | <b>10ng</b>   | <b>25ng</b>   | <b>50ng</b>   | <b>100ng</b>  | <b>250ng</b>  | -----        |

Concentraciones de DNA con las que se realizó la curva de estandarización para la metodología que se seleccionara para la plataforma de PCR-tiempo real.

## Curva de DNA

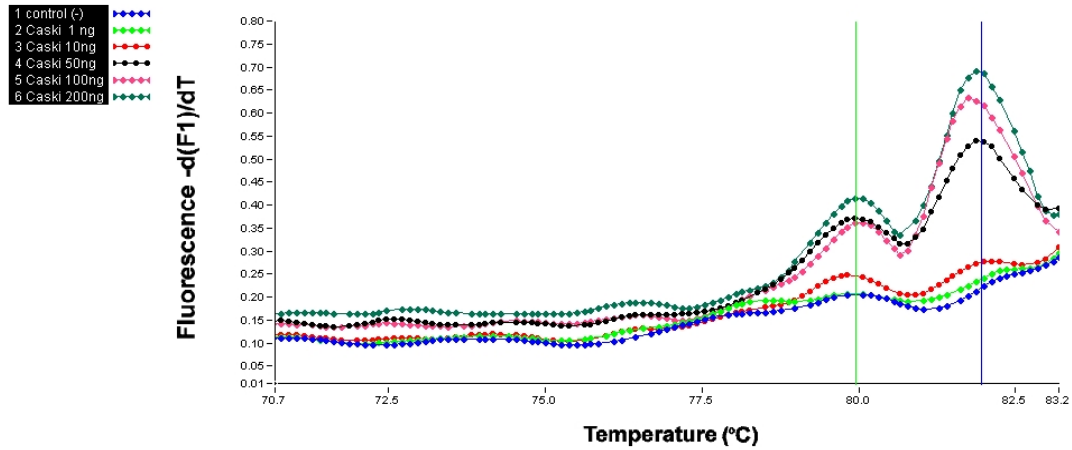
File: C:\LightCycler3\Users\iris\Data\HPV-16 0.2pr 201005.DNA caski.curv.ABT Program: AMPLIFICACION Run By: iris  
 Run Date: Oct 20, 2005 15:52 Print Date: 21 de Febrero de 2006



Baseline Adjustment: Arithmetic Noise Band Cursor: NA Analysis Method: Second Derivative Maximum

Color Compensation: Off

File: C:\LightCycler3\Users\iris\Data\HPV-16 0.2pr 201005.DNA caski.curv.ABT Program: MELTING CURVE Run By: iris  
 Run Date: Oct 20, 2005 15:52 Print Date: 21 de Febrero de 2006



Digital Filter: Enabled Calculation Method: Polynomial

Degrees to Average: 4.0 Red cursor Tm = 67.3495 Yellow cursor Tm = 68.0120 Green cursor Tm = 79.9573

Color Compensation: Off Blue cursor Tm = 81.9634



File: C:\LightCycler3\Users\Administrator\Data\NURIA280503-dna-curva.ABT Program: MELTING CURVE Run By: Administrator  
Run Date: May 28, 2003 17:36 Print Date: 12 de Octubre de 2006

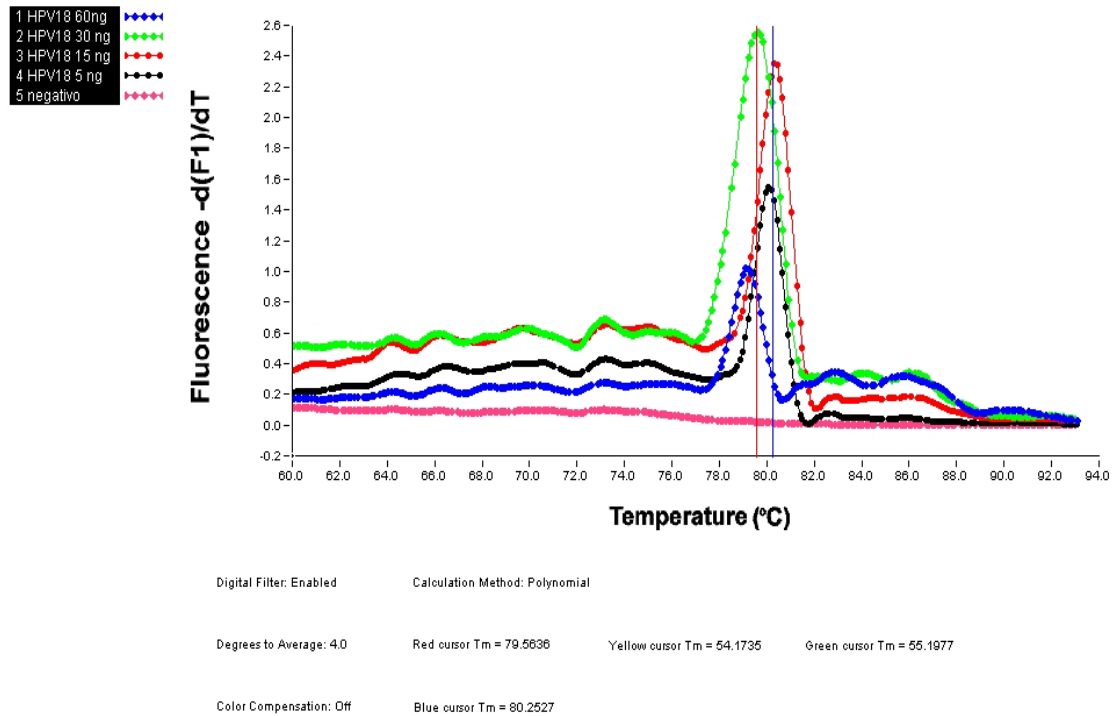


Fig. 12,13,14. Curva de Estandarización de DNA

Las figuras anteriores muestran los resultados de las pruebas de estandarización que se realizaron para determinar la concentración óptima de primers y DNA para dicha metodología.

Tabla 4. Curva de Primers MY09/11

| REACTIVO          | Tubo 1  | Tubo 2  | Tubo 3 | Tubo 4 | Tubo 5 | C (-)   |
|-------------------|---------|---------|--------|--------|--------|---------|
| H <sub>2</sub> O  | 6 µl    | 5.6 µl  | 5.2 µl | 4.8 µl | 4.4 µl | 8 µl    |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.6 µl  | 1.6 µl  | 1.6 µl | 1.6 µl | 1.6 µl | 1.6 µl  |
| Primer 1          | 0.15 µl | 0.25 µl | 0.2 µl | 0.1 µl | 0.2 µl | 0.15 µl |
| Primer 2          | 0.25 µl | 0.15 µl | 0.1 µl | 0.2 µl | 0.2 µl | 0.25 µl |
| Mix Syber         | 1 µl    | 1 µl    | 1 µl   | 1 µl   | 1 µl   | 1 µl    |
| DNA prob          | 10ng    | 10ng    | 10ng   | 10ng   | 10ng   | -----   |

Curva de concentraciones de primer, mediante la cual determinamos la concentración ideal para la metodología que se quiere implementar.

CURVA DE PRIMERS MY09/11

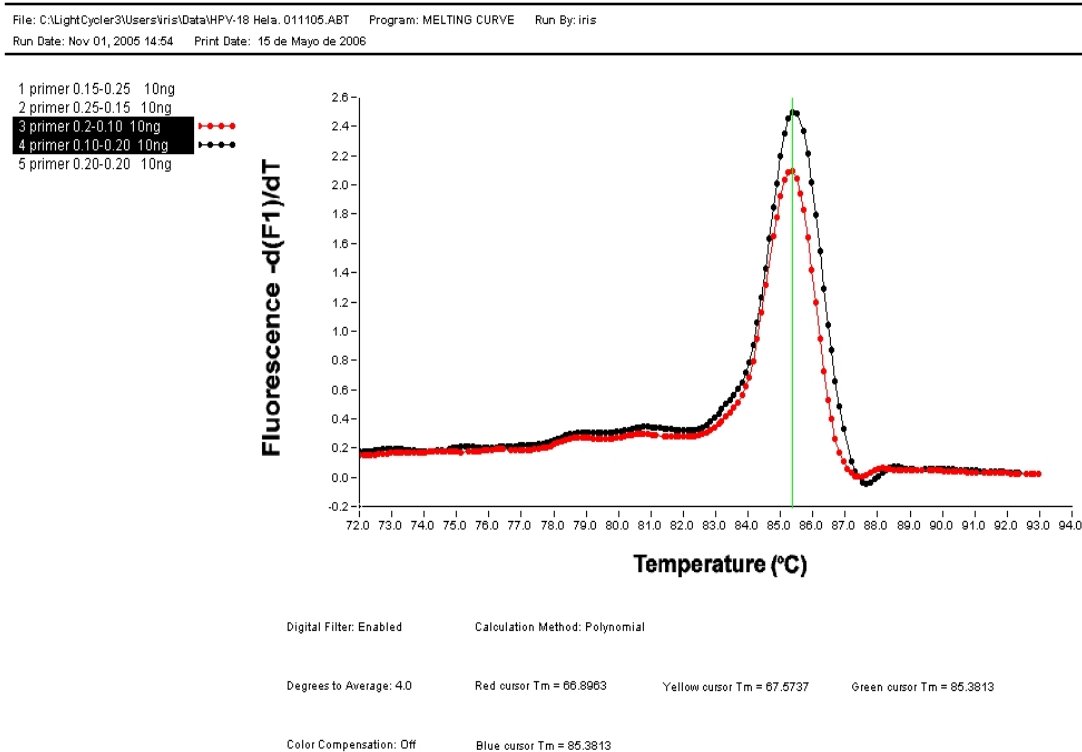


Fig. 13. Curva de primers

VALORES DEL METODO ESTANDARIZADO DE PCR-TIEMPO REAL

OLIGOS MY09/11

| REACTIVOS         | CONTROL (-)           | CONTROL (+)           | MUESTRA PROBLEMA      |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| H <sub>2</sub> O  | cbp 10µl de vol.final | cbp 10µl de vol.final | cbp 10µl de vol.final |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.6 µl                | 1.6 µl                | 1.6 µl                |
| Primer MY09       | 0.1 µl                | 0.1 µl                | 0.1 µl                |
| PrimerMY11        | 0.2 µl                | 0.2 µl                | 0.2 µl                |
| Mix Syber         | 1 µl                  | 1 µl                  | 1 µl                  |
| DNA prob          | -----                 | 200ng                 | 200ng                 |

OLIGOS GP'S

| REACTIVOS         | CONTROL (-)           | CONTROL (+)           | MUESTRA PROBLEMA      |
|-------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| H <sub>2</sub> O  | cbp 10µl de vol.final | cbp 10µl de vol.final | cbp 10µl de vol.final |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.2 µl                | 1.2 µl                | 1.2 µl                |
| Primer 1          | 0.3 µl                | 0.3 µl                | 0.3 µl                |
| Primer 2          | 0.3 µl                | 0.3 µl                | 0.3 µl                |
| Mix Syber         | 1 µl                  | 1 µl                  | 1 µl                  |
| DNA prob          | -----                 | 200ng                 | 200ng                 |

Con la metodología estandarizada y establecidos los valores óptimos para el protocolo de detección y tipificación del virus del papiloma humano mediante la PCR en tiempo real. Se analizan las muestras problemas, con los valores establecidos.

## DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DE MUESTRAS PROBLEMA

File: C:\LightCycler3\Users\iris\Data\mtasprob.131105(2).ABT Program: MELTING CURVE Run By: iris  
Run Date: Nov 13, 2005 17:34 Print Date: 13 de Noviembre de 2005

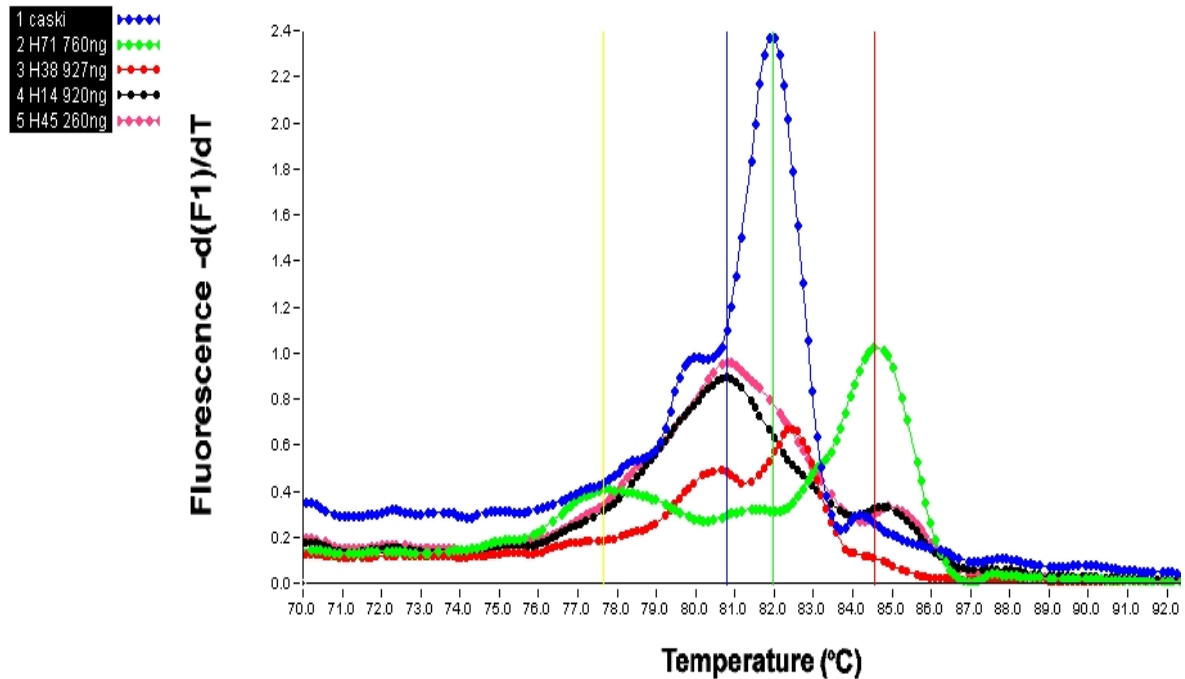


Fig. 14. Ejemplo de muestras problemas con oligos MY09/11.

Ya estandarizado el método y con la obtención de los resultados, se realizó la detección y tipificación con muestras problema, para determinar la presencia de HPV y el tipo viral presente. Estas graficas muestran la  $T_m$  de **82 °C** para HPV 16 y algunas de las muestras positivas para dicho tipo viral. Para el tipo viral HPV-18 se encontró una  $T_m$  de **85°C**. Utilizando el juego de oligos MY 09/11.

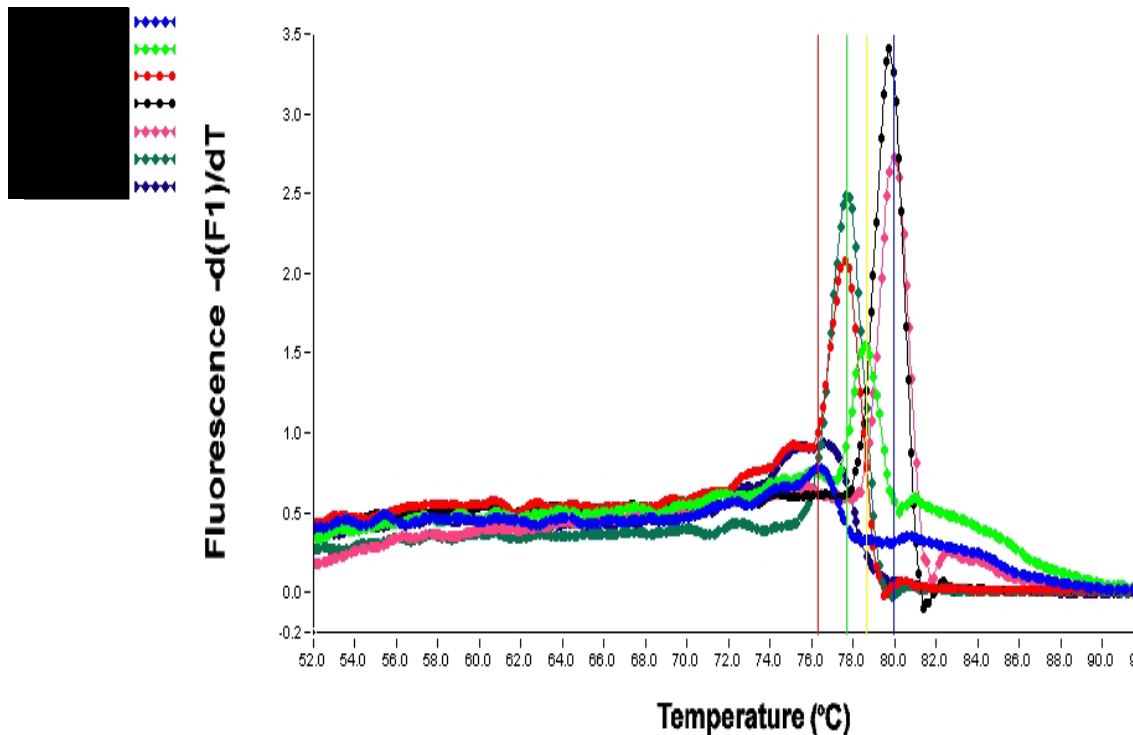


Fig. 15. Amplificación de muestras problema con oligos GP+

Se probaron los oligos GP's para la detección y tipificación del HPV con las muestras problemas (figura 15), donde se observa una  $T_m$  específica para cada tipo viral, de **79°C** para HPV 16 y de **80°C** para HPV 18. Comprobando el resultado mediante un gel de agarosa.

De las 86 muestras, 20 fueron positivas para HPV-16 y 8 fueron positivas para HPV-18. Representando así el 23% y el 9.5% respectivamente.

## X. DISCUSIÓN

El cáncer cérvico uterino (CaCu) es un problema de salud pública en países en vías de desarrollo. Se diagnostican 500 000 casos nuevos por todo el mundo. Se conocen más de 100 tipos de HPV y se sabe actualmente que por lo menos 70 de ellos pueden infectar la zona anogenital.

Desafortunadamente, es difícil establecer los métodos de detección o de caracterización de infecciones por HPV, así como determinar cada tipo viral.

Ciertas regiones específicas de HPV se utilizan para construir los oligonucleótidos que pueden amplificar diversos tipos de HPV. Se han diseñado diversos oligonucleótidos universales complementarios a la región L1 de HPV.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método altamente sensible que ha demostrado ser una herramienta eficaz y el método más sensible para la detección de varios tipos de HPV. Sin embargo, el análisis de los productos de PCR es ambiguo. Los métodos convencionales de análisis de los productos de PCR, tales como geles de agarosa y bromuro de étido demuestran bandas múltiples, haciendo difícil la interpretación de los datos. Por lo tanto la tarea de diseñar un análisis que detecte e identifique la infección por HPV y por el tipo, ha sido indispensable.<sup>32</sup>

Este estudio se centró básicamente en detectar los tipos virales 16 y 18, probando 2 tipos de oligonucleótidos que son MY09/11 y GP's, utilizando el método de PCR en tiempo real. Realizando el análisis de curvas melting y determinando las Tm específicas para cada tipo viral.

Primero se utilizaron los "primers" My09/11, que amplifican la región común L1 del HPV, estos generan un amplificado de aproximadamente 450pb y tiene ciertos inconvenientes como es el no permitir la detección del HPV-35, también su sensibilidad esta limitada ya que son primers que no son idénticos a la secuencia o "primers degenerados".

En algunos casos donde el DNA es de mala calidad y la amplificación con dichos primers se ve muy limitada, ya sea por el tamaño de amplificación tan grande de los primers o por contaminación, que afecta los resultados por la sensibilidad del equipo, dando falsos positivos o curvas-melting inespecíficas.

Por tal motivo se utilizaron otros primers que también están basados en amplificar la región común L1 del HPV, como son los GP5+/GP6+, que amplifican un fragmento de 150pb.

Con este juego de primers (GP5+/GP6+) observamos una mayor precisión en la detección de los tipos virales HPV16/18, mostrando un curvas-melting con mayor definición y con un pico de fluorescencia mas alto que los MY, el inconveniente de dichos primers es que detectan menos tipos virales de HPV en comparación con los oligos MY.

El análisis de las curvas melting obtenidas, nos permitió determinar el tipo viral (HPV 16/18) presente en las muestras, ya que cada fragmento de DNA amplificado tiene una  $T_m$  específica, haciendo del análisis una herramienta útil para la tipificación del HPV.

Con los resultados que obtuvimos se observa que cada juego de primers (GP's y MY) nos proporciona diferentes temperaturas melting ( $T_m$ ) para cada tipo viral (HPV-16/18), esto se debe al diseño de su secuencia y el fragmento de DNA que identifica cada oligo. Esta diferencia en las  $T_m$  no indica que no se identifiquen los productos específicos.

Su comportamiento y las curvas de cada juego de oligonucleotidos, nos da la opción de determinar que primers son los más convenientes de usar, para disminuir la posibilidad de falsos positivos.

Otra condición de uso es también el número y los tipos virales que identifica cada par de oligos.

Con respecto al equipo de PCR en tiempo real, es un equipo que con su aplicación simplifica el análisis, cuantificación y detección de agentes infecciosos como es el caso del HPV, este equipo se ha perfeccionado para la aplicación de PCR rápidas, las cuales toman de 30-50 minutos, el análisis de



los resultados es sencillo y pueden ser monitoreados durante el proceso de reacción. Quizás una desventaja radica en su relativo costo elevado del equipo, en que se tiene que disponer de un área adecuada y de personal especializado, ya que su extremada sensibilidad puede plantear problemas de contaminación e incluso de interpretación diagnóstica equivocada.

Debido a sus ventajas, la facilidad de empleo y la rapidez, la PCR en tiempo real irá reemplazando a la PCR convencional y ampliando el abanico de aplicaciones.

Analizando los resultados obtenidos y haciendo una recopilación de las condiciones de estandarización obtenidas con cada juego de oligonucleótidos, determinamos la metodología y/o el protocolo a seguir para la detección y tipificación del HPV (16/18) utilizando la plataforma de PCR tiempo-real.  
(ver anexo 1)

De las 86 muestras, 20 fueron positivas para HPV-16 y 8 fueron positivas para HPV-18. Representando así el 23% y el 9.5% respectivamente. Con ambos juegos de oligonucleótidos.

## XI. CONCLUSIONES

Se propone y/o presenta un protocolo (anexo 1) rápido y preciso basado en PCR en tiempo real, que detecta HPV 16/18 a partir de cepillados cervicales y que da resultados en no más de una hora.

El desarrollo de nuevos métodos de detección y con los resultados obtenidos se demostró que la técnica de amplificación del gen L1 del HPV utilizando los oligos GP+ y My09/11 en la plataforma de PCR tiempo-real es un método sensible, y rápido para la detección de genotipos de alto riesgo (HPV 16/18). Garantizando una prueba de detección de 1 hora. La cual queda implementada en el laboratorio de Oncología Molecular y podría implementarse en la clínica como un método rápido de monitoreo.

Sin embargo, se deben de analizar y tomar en cuenta diversas condiciones para decidir, en que momento se usa uno u otro par de oligonucleotidos para la detección óptima del HPV o los métodos menos costosos y/o más fáciles.

De las lesiones cervicales estudiadas, 20 / 86 fueron positivas para HPV-16 y 8/86 resultaron positivas para HPV-18 – con ambos juegos de oligonucleotidos. – Representando así el 23% y el 9.5% respectivamente (y señalando en conjunto que el 32.5% de las lesiones estudiadas están asociadas a virus inductores de carcinoma cérvico uterino).

## XII. REFERENCIAS

- 1) Stoler, M. H.. Human Papillomavirus Biology and cervical neoplasia. Arch Pathol Lab Med, 2003; 127: 935- 939.
- 2) Munger, K; Baldwin, A; Edwards, K. M; Hayakawa, H; Nguyen, C. L; Owens, M; Grace, M and Huh, K. W. Mechanism of human Papillomavirus- Induced Oncogenesis. Journal of Virology, 2004; 78: 11451- 11460.
- 3) Chen, Y- C and Hunter, J.D. Molecular Epidemiology of Cancer. CA Cancer J. Clin, 2005; 55: 45- 54.
- 4) Burd, M. E. Human Papillomavirus and cervical Cancer. Clinical Microbiology Reviews, 2003; 16: 1- 17.
- 5) Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ, Duggan-Keen MF, Glenville S, Telford N, Little AM, Davidson JA, Jimenez P, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Stern PL. Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. Tissue Antigens 2000 May; 55(5):401 -11.
- 6) Cuzick J, Terry G, Ho G, Monaghan J, Lopes A, Clarkson P, Duncan L. Association between high-risk HPV types, HLA DRB1\* and DQB1\* alleles and cervical cancer in British women. Br J Cancer 2000; 82(7): 1348-52.
- 7) Huan H. Nguyen, Thomas R. Broker, Louise T. Chow, Ronald D. Alvarez, Huong L. Vu, Judit Andrasi, Lorie R. Brewer, Gen Jin, Jiri Mestecky. Immune response to human papillomavirus in genital tract of women with cervical cancer. Gynecologic Oncology 96 (2005), 452-461.
- 8) Hubbard, Roger A. Human Papillomavirus Testing Methods. Arch Pathol Lab Med. Vol. 127, August 2003.
- 9) Rivera R. et al. Epidemiología del Virus Papiloma Humano. Rev. Chil.Obstet. Ginecol 2002; 67(6):501-506.
- 10) Motoyama, S; Ladines- Llave, A. C; Villanueva, L. S and Marvo, T. The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of cervical Carcinogenesis. Kobe J. Med Sc, 2004; 50: 9- 19.
- 11) Hildesheim A, Schiffman MH, Gravitt PE, Glass AG, Greer CE, Zhang T, Scott DR, Rush BB, Lawler P, Sherman ME, et al. Persistence of type-

- specific human Papillomavirus infection among cytologically normal women. *J Infect Dis.* 1994 Feb; 69(2):23540.
- 12) Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal Papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338(7):423-8.
- 13) Muñoz, N. Et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *The New England Journal of Medicine*, February 6, 2003. 348:6.
- 14) Siegfried Kôsel, Siegfried Burggraf, Jens Mommsen, Werner Engelhardt and Bernhard Olgemôller. Type-Specific Detection of Human Papillomaviruse in a Routine Laboratory Setting-Improved Sensitivity and Specificity of PCR and Sequence Analysis Compared to Direct Hybridization. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41(6): 787-791.
- 15) Costa Joseph. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm. Infecc. Microbiol Clin.* 2004; 22(5):299-305.
- 16) Kosel, S; Burggraf, S; Momssen, J; Engenhard, W and Olgemoler, B. Type- Specific detection of Human Papillomaviruse in a Routine laboratory Setting- Improved Sensitivity and Specificity of PCR and Sequence Analysis Compared to Direct Hybridization. *Clin Chem Lab Med*, 2003; 41: 787- 791.
- 17) William Irvin, MD, S:R: Evans, MD, Willie Andersen, Md, Amir Jazaeri, MD, Peyton Taylor, MD; Mark Stoler, MD, Lisa Pastore, PhD, Laurel Rice, MD. The utility of HPV DNA triage in the management of cytological AGC. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2005; 193: 559-5567.
- 18) Holger Moch, Meter Schraml, Lukas Bubendorf, Martina Mirlacher, Juha Kononen, Thomas Gasser, et al. High-Throughput Tissue Microarray Analysis to Evaluate Genes Uncovered by cDNA Microarray Screening in Renal Cell Carcinoma. *American Journal of Pathology*, April 1999; Vol. 154, No. 4.
- 19) TaeJeong OH, ChangJin Kim, SukKyung Woo, TaeSeung Kim, DongJun Jeong, MyungSoon Kim, Sunwoo Lee, HyunSill Cho, and Sungwhan An. Development and Clinical Evaluation of a Highly Sensitive DNA

- Microarray for Detection and Genotyping of Human Papillomaviruse. Journal of Clinical Microbiology, July 2004. 3272-3280.
- 20) [Wei Sheng Yan Jiu](#). Modified molecular beacon-based dual real-time PCR for detection of SARS virus and its application, 2005; 34(4):416-8.
- 21) Franco, L. E; Franco- Duarte, E and Ferenczy, A. Cervical cancer, epidemiology, prevention and the role of human Papillomavirus infection. CMAJ, 2001; 164: 1017- 1025.
- 22) Follen Michellen, Meyskens Frank L., Jr., D. Alvarez Ronald, L Joan. Walker et all. Cervical Cancer Chemoprevention, Vaccines, and Surrogate Endpoint Biomarkers. American Cancer Society. 2003; 98(9 Suppl): 2044-51.
- 23) Peng, S; Ji, H; Trimble, C; He, L; Tsai, Y- C; Yeatermeyer, J; Boyd, K. A. D, Hung, C- F and Wu, T- C. Development of a DNA vaccine Targetin Human Papillomavirus Type 16 Oncoprotein E6. Journal of virology, 2004; 78: 8468- 8476.
- 24) Yang, H; Khafagy, A; Tang, Y; Carey, T. E. Opipari, A. W; Lieberman, R; Oeth, P. A; Lancaster, W; Klinger, H. P; Kaseb, A. O; Metwall, A; Khaled, H and Kurnit, D. M. Sensitive detection of human Papillomavirus in cervical, head/ neck and schistosomiasis- associated bladder malignancies. PNAS, 2005; 102: 7683- 7688.
- 25) Cubie, Ha; Seagar, Al; McGoogan, E; Whitehead, J; Brass, A; Arends, M J; Whitley, M W. Rapid real time PCR to distinguish between high risk human Papillomavirus types 16 and 18. British Medical Journal. February 2001. Vol. 54(1).
- 26) [Fujimoto T, Okafuji T, Okafuji T, Ito M, Nukuzuma S, Chikahira M, Nishio O](#). Evaluation of a bedside immunochromatographic test for detection of adenovirus in respiratory samples, by comparison to virus isolation, PCR, and real-time PCR. J Clin Microbiol. 2004 Dec; 42(12):5489-92.
- 27) W. Hart Keith, O. Williams Martin, Thelwell Nicola, N. Fiander Alison. Novel Method for Detection, Typing, and Quantification of Human Papillomavirus in Clinical Samples. Journal of Clinical Microbiology, Sept. 2001. 3204-3212.

- 28) Szuhai Károly, Sandhaus Emily, M Sandra. Kolkman-Uljee, Lemaitre Marc, Truffert Jean-Christophe. A Novel Strategy for Human Papillomavirus Detection and Genotyping with SybrGreen and Molecular Beacon Polymerase Chain Reaction. American Journal of Pathology. November 2001, Vol. 159, No. 5.
- 29) JF Snijders Peter, JC van de Brule Adriaan, JLM Meijer Chris. The clinical relevance of human Papillomavirus testing: relationship between analytical and clinical sensitivity. Journal of Pathology. 2003; 201: 1-6.
- 30) Van Doornum GJ, Guldemeester J, Osterhaus AD, Niesters HG. Diagnosing herpesvirus infections by real-time amplification and rapid culture. J Clin Microbiol. 2003 Feb; 41(2):576-80.
- 31) Padilla-Paz Luis Alfonso, MD. Emerging Technology in Cervical Cancer Screening: Status of Molecular Markers. Clinical Obstetrics and Gynecology, 2005. Volumen 48. No. 1. 218-225.
- 32) W. Dietmaier, C. Wittwer, N. Sivasubramanian (Eds.). Rapid Cycle Real-Time PCR. Methods and Applications Genetics and Oncology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2002. 47-56, 147-157.
- 33) K. Wolf Judith, L. Franco Eduardo, M Arbeit Jeffery, R Shroyer Kenneth, Twyy-Choou Wu, et al. Innovations in Understanding the Biology of Cervical Cancer. American Cancer Society. 2003.
- 34) [Allen D, Butt A, Cahill D, Wheeler M, Popert R, Swaminathan R.](#) Role of cell-free plasma DNA as a diagnostic marker for prostate cancer. Ann N Y Acad Sci. 2004 Jun; 1022:76-80.
- 35) Mahdavi Ali, Monk Bradley J. Vaccines Against Human Papillomavirus and Cervical Cancer: Promises and Challenges. The Oncologist 2005; 10:528-538.
- 36) Giannoudis Athina, Herrington C. Simon. Human Papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. Journal of Pathology. 2001; 193: 295-302.
- 37) <http://geosalud.com/VPH/epivph.htm>
- 38) H. Yang, K. Yang, A Khafagi, Y. Tang, T. E. Carey, A. W. Opipari, R. Lieberman, P. A. Oeth, W. Lancaster, H. P. Klinger, A. O. Kaseb, A. Metwally, H. Khaled, and D. M. Kurnit. Sensitive detection of human

- Papillomavirus in cervical, head/neck, and schistosomiasis-associated bladder malignancies. PNAS. May 24, 2005. Vol. 102. No.21. 7683-7688.
- 39) Jane J, Wright Kim Thomas C, Goldie Sue J. Cost-effectiveness of Human Papillomavirus DNA Testing in the United Kingdom, The Netherlands, France, and Italy. Journal of the National Cancer Institute, Vol. 97. No. 12, June 15, 2005.
- 40) K. S. Cuschieri, H A Cubie, M W Whitley, A L Seagar, M J Arends, C Moore, G Gilkisson, E McGoogan. Multiple high risk HPV infections are common in cervical neoplasia and young women in a cervical screening population. J Clin Pathol 2004; 57:68-72.
- 41) [Lo KW, Yeung SW, Cheung TH, Siu NS, Kahn T, Wong YF.](#) Quantitative analysis of human Papillomavirus type 16 in cervical neoplasm: a study in Chinese population. J Clin Virol. 2005 Sep; 34(1):76-80.
- 42) Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ. Human Papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. Obstet Gynecol 1992; 79(3):328-37.
- 43) Moberg Martin, Inger Gustavsson, Ulf Gyllensten. Real-Time PCR-Based System for Simultaneous Quantification of Human Papillomavirus Types Associated with High Risk of Cervical Cancer. Journal of Clinical Microbiology, July 2003, p. 3221-3228.
- 44) Organización Panamericana de la Salud. El Control de las Enfermedades Transmisibles. Decimoséptima Edición. Washington, 2001.
- 45) P. E. Gravitt, C. L. Peyton, T.Q. Alessi, C.M. Wheeler, F. Coutlee, A. Hildesheim, M. H. Schiffman, D.F. Scout, and R. J. Apple. Improved Amplification of Genital Human Papillomavirus. Journal of Clinical Microbiology, Jan. 2000. 357-361.
- 46) Tonon Sergio Andrés, Ferreras Julián Alberto, Liotta Domingo Javier, Bos Paula Daniela, Galuppo Juan, Zinovich Jorge Bruno. Identification of Human Papilloma Virus 16 in Uterine Cervix Smears. Revista Latinoamericana de Microbiología. 2000. 42:117-120.

- 47) Vernor, D. S; Unger, R.E and Williams, D. Comparison of Human Papillomavirus Detection and Typing by Cycle Sequencing, Line Blotting and Hybrid Capture. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000; 38: 651- 655.
- 48) Yuang, H; Estes, A. P; Chen, Y; Newsome, J; Olcese, A. V; Garcea, L. R and Schlegel, R. Immunization with a Pentameric L1 fusion Protein Protects against Papillomavirus Infection. *Journal of Virology*, 2001; 75: 7848- 7853.



### XIII. GLOSARIO

|        |   |
|--------|---|
| DNA    | Ácido Desoxirribonucleico   |
| HLA    | Human Leukocyte antigens o Antígenos de Histocompatibilidad humanos     |
| HPV    | Virus de papiloma humano  |
| IHQ    | Inmunohistoquímica  |
| MHC    | Major histocompatibility complex o Sistema mayor de histocompatibilidad |
| μl     | Microlitro  |
| ng     | Nanogramos  |
| PCR    | Reacción en cadena de la Polimerasa                                     |
| Primer | Oligonucleótido   |
| pb     | Pares de bases  |
| pRb    | Proteína de retinoblastoma  |
| p21    | Proteína de 21 KDaltones o Quinasa p21                                  |

## XV. ANEXOS

### PROTOCOLO DE PCR-TIEMPO REAL

#### OLIGOS MY09/11

1. Limpiar la campana e irradiar con luz UV durante 5 min
2. Prepara la mezcla de reacción con volumen final de 10  $\mu$ L

| <b>REACTIVOS</b>  | <b>CONTROL (-)</b>          | <b>CONTROL (+)</b>          | <b>MUESTRA PROBLEMA</b>     |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| H <sub>2</sub> O  | cbp 10 $\mu$ l de vol.final | cbp 10 $\mu$ l de vol.final | cbp 10 $\mu$ l de vol.final |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.6 $\mu$ l                 | 1.6 $\mu$ l                 | 1.6 $\mu$ l                 |
| Primer MY09       | 0.1 $\mu$ l                 | 0.1 $\mu$ l                 | 0.1 $\mu$ l                 |
| PrimerMY11        | 0.2 $\mu$ l                 | 0.2 $\mu$ l                 | 0.2 $\mu$ l                 |
| Mix Syber         | 1 $\mu$ l                   | 1 $\mu$ l                   | 1 $\mu$ l                   |
| DNA prob          | -----                       | 200ng                       | 200ng                       |

3. Poner la mezcla de reacción en cada capilar
4. Tapar el capilar control, para evitar la contaminación
5. Sacar DNA problema y aplicar a cada capilar
6. Tapar los capilares
7. Centrifugar 5-10 seg los capilares
8. Poner los capilares en el Termociclador de PCR-tiempo real y programar el equipo.

OLIGOS GP's

1. Limpiar la campana e irradiar con luz UV durante 5min
2. Prepara la mezcla de reacción con volumen final de 10  $\mu$ L

| <b>REACTIVOS</b>  | <b>CONTROL (-)</b>          | <b>CONTROL (+)</b>          | <b>MUESTRA PROBLEMA</b>     |
|-------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| H <sub>2</sub> O  | cbp 10 $\mu$ l de vol.final | cbp 10 $\mu$ l de vol.final | cbp 10 $\mu$ l de vol.final |
| MgCl <sub>2</sub> | 1.2 $\mu$ l                 | 1.2 $\mu$ l                 | 1.2 $\mu$ l                 |
| Primer 1          | 0.3 $\mu$ l                 | 0.3 $\mu$ l                 | 0.3 $\mu$ l                 |
| Primer 2          | 0.3 $\mu$ l                 | 0.3 $\mu$ l                 | 0.3 $\mu$ l                 |
| Mix Syber         | 1 $\mu$ l                   | 1 $\mu$ l                   | 1 $\mu$ l                   |
| DNA prob          | -----                       | 200ng                       | 200ng                       |

3. Poner la mezcla de reacción en cada capilar
4. Tapar el capilar control para evitar la contaminación
5. Sacar DNA problema y aplicar a cada capilar
6. Tapar los capilares
7. Centrifugar 5-10 seg los capilares
8. Poner los capilares en el Termociclador de PCR-tiempo real y programar el equipo.

## CARTA DE ACEPTACIÓN

MÉRIDA  
2005



Del 14 al 18 de noviembre de 2005 en Mérida, Yucatán.

XIV Foro Nacional  
Investigación en Salud

México DF a 06 de Octubre de 2005

Oficio no. 09 B5 61 2800/5764

**INVESTIGADOR(A) Cinthia Perea Montoya**  
**ADSCRIPCIÓN UIMEO Laboratorio de Oncología Molecular CMN Siglo XXI**  
**DELEGACIÓN DISTRITO FEDERAL**

Número de resumen: **218**

Título del resumen: **VALIDACION Y ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO (HPV 16/18) A PARTIR DE MUESTRAS DE LESIONES CERVICALES MEDIANTE EL USO DE LA PCR EN TIEMPO REAL**

Autores:

**C. Adriana Ruiz Lopez**  
**Patricia Zamora Perez**  
**Ortensia Solorsano Bárcenas**  
**Rosa María Chi Rodríguez**  
**Martha Tena Suck**  
**Sebastián Castillo Medina**  
**Juan Alejandro Silva**  
**Horacio Astudillo de la Vega**

Le comunico que su trabajo de investigación fue aceptado para ser presentado durante el **XIV Foro Nacional de Investigación en Salud**, que se realizará en la ciudad de Mérida, Yucatán del 14 al 18 de noviembre del año en curso. La aceptación de su trabajo ocurrió después de un proceso de evaluación por pares, del cual solamente se seleccionaron 523 de un total de 870 trabajos enviados.

Para esta edición, los trabajos aceptados se presentarán en dos modalidades, desayunos académicos y sesiones de carteles. Su trabajo será discutido durante la sesión **1** de desayunos académicos que se llevará a cabo el **miércoles 16** de noviembre de 8 a 10 de la mañana, en el Hotel Hyatt Regency.

Las tres sesiones de carteles se realizarán en el Hotel Fiesta Americana, por lo que le solicitamos colocar su cartel el día **jueves 17** de noviembre, a partir de las 8 AM, y estar presente para su discusión durante la sesión **2**, programada de las **10:00-12:00** horas.

Todos los asistentes al foro con trabajo aceptado, deberán cubrir la cuota de inscripción la cual les dará derecho a asistir a las conferencias, simposio, a un desayuno académico, a las sesiones de carteles, así como a las actividades culturales, sociales y deportivas. Le recomendamos hacer con anticipación su inscripción al Foro a través de la página electrónica de la Coordinación de Investigación en Salud: [www.cis.gob.mx](http://www.cis.gob.mx), donde también encontrará las instrucciones para la preparación de su cartel.

En espera de darle la bienvenida en Mérida, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

Atentamente,

**DR. JOSE DANTE AMATO MARTÍNEZ**

Coordinador de Investigación en Salud

Presidente del Comité Organizador de la **COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD**

Edificio Biología, 1o piso de la Unidad de Congresos del Centro Médico Nacional Siglo XXI



CONSTANCIA

**MÉRIDA**  
**2005**  


Del 14 al 18 de noviembre de 2005 en Mérida, Yucatán.

**XIV Foro Nacional  
Investigación en Salud**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS DE SALUD**

Otorgan la presente

**CONSTANCIA**

A:  
*Perea-Montoya Cinthia, Zamora-Pérez Patricia, Ruiz-Lopez C. Adriana, Solarsano-Bárceñas Ortensia, Chi-Rodríguez Rosa María, Tena-Suck Martha, Castillo-Medina Sebastián, Alejandro-Silva Juan, Astudillo-De la Vega Horacio,*

por la presentación del trabajo de investigación titulado:

**"VALIDACION Y ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE DETECCIÓN Y TIPIFICACIÓN DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO DE ALTO RIESGO (HPV 16/18) A PARTIR DE MUESTRAS DE LESIONES CERVICALES MEDIANTE EL USO DE LA PCR EN TIEMPO REAL"**

Mérida, Yucatán, Noviembre de 2005.

  
**Dr. José Dante Amato Martínez**  
Presidente del Comité Organizador

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
Edificio Bloque "B" 4o. piso de la Unidad de Congresos del Centro Médico Nacional "Siglo XXI"  
Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores, C.P. 06725 México, D.F.  
Tel.: 5761-08-41 • Fax: 5761-0952 • xivforo@cis.gob.mx

[www.cis.gob.mx](http://www.cis.gob.mx)

CARTEL



**Validación y Estandarización de un protocolo de Detección y tipificación del Virus del Papiloma Humano de Alto riesgo (HPV 16/18) a partir de muestras de lesiones cervicales mediante el uso de la PCR en tiempo real.**

**Perea-Montoya C\*, Ruiz-López A\*, Zamora-Pérez P\*, Solórzano-Barcenas O\*\*, Chi-Rodríguez RM\*\*, Tena-Suck M\*\*\*, Castillo-Medina S\*\*\*\*, Silva-Alejandro J\*\*\*\*, Astudillo-de la Vega H<sup>u</sup>.**

\*Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas (UIMEO), Hospital de Oncología (HO) CMN Siglo XXI. \*\*Departamento de Ginecología y Colposcopia Hospital de Gineco-Obstetricia de Tlaloteco del IMSS. \*\*\*Departamento de Patología, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, SSA. \*\*\*\*Laboratorio de Histología y Microscopía Electrónica UIMEO, HO, CMN SXII, IMSS. \*\*\*\*\*Departamento de Oncología Médica, Hospital de Oncología, CMN SXII, IMSS.   
ΨAv. Cuauhtemoc 330 Col. Doctores CP 07420, México, D.F. México. e-mail: hastud2@aol.com

**Antecedentes.** Epidemiológicamente se han identificado a las infecciones por Virus del Papiloma Humano (HPV) como el mayor factor de riesgo asociado al desarrollo de cáncer de cérvix, el cual es comúnmente transmitido por vía sexual. El cáncer cervical es la 2ª causa mas frecuente de muertes por cáncer en las mujeres de todo el mundo(1). Actualmente se han identificado más de 100 tipos de HPV clínicamente. El HPV infecta las membranas epiteliales y mucosas. Son clasificados en diferentes tipos dependiendo a homologías en su material genético. El método de la PCR punto final es el más comúnmente utilizado para su detección.

**Objetivos.** Desarrollar una metodología rápida, económica y sensible basada en la PCR tiempo-real para la detección y tipificación de HPV de alto riesgo a partir de biopsias de cepillados cervicales.

**Material y Métodos.** A partir de muestras clínicas de mujeres con diferentes grados de lesiones cervicales (n=100), se extrajo el DNA por el método de columnas de sílica-gel (www.qiagen.com), se cuantificó el DNA por espectrofotometría y se diseñó un protocolo utilizando los oligos GP+ y MY09/11 (2,3) para PCR en tiempo real.

Se utilizó el sistema de amplificación de PCR en tiempo real de la marca LightCycler (ROCHE) para amplificar en capilares de policarbonato. Se purificó DNA de líneas celulares infectadas con HPV conocidos como HeLa y Caski para obtener material de referencia para la amplificación del gen L1 del HPV. Se muestran las condiciones de amplificación logradas para dicha amplificación:

| Primers | Lenght                   | GC(%) | Tm(°C) |
|---------|--------------------------|-------|--------|
| GP5+    | GATCCAGAAGGTACCGACGGGAGG | 24    | 47.3   |
| GP6+    | CCACTTCAGTAAGCAAAACAATC  | 20    | 50.0   |
| MY09    | CSTCCMARRGGAWACTGATC     | 20    |        |
| MY11    | GCMCAGGGWCATAAATGG       | 20    |        |

| Mezcla de Reacción               | Volumen [uL]                    | [Final]  |
|----------------------------------|---------------------------------|----------|
| 10X 35.5mM MgCl2 reaction buffer | 1                               | 3.5mM    |
| dNTPs                            | 1                               | 2mM      |
| GP5+ ó MY09 (primer forward)     | 0.1                             | 0.25uM   |
| GP6+ ó MY11 (primer reverse)     | 0.1                             | 0.25uM   |
| DNA control positivo (plásmido)  | 1                               | 1-10ng   |
| DNA problema                     | 1                               | 50-250ng |
| Agua                             | Ajustar a volumen final de 10uL |          |

**Programa de Amplificación**

| Ciclos                             | 60 (GP+) y 75 (MY) |                  |            |
|------------------------------------|--------------------|------------------|------------|
|                                    | Segmento 1         | Segmento 2       | Segmento 3 |
| Target Temperature [°C]            | 95                 | 40(GP+) ó 47(MY) | 72         |
| Incubation Time [s]                | 10                 | 5                | 10         |
| Temperature transition rate [°C/s] | 20                 | 20               | 20         |

**Curva de Disociación**

| Ciclos                             | 1          |                  |            |
|------------------------------------|------------|------------------|------------|
|                                    | Segmento 1 | Segmento 2       | Segmento 3 |
| Target Temperature [°C]            | 95         | 50(GP+) ó 42(MY) | 95         |
| Incubation Time [s]                | 0          | 15               | 0          |
| Temperature transition rate [°C/s] | 20         | 20               | 0.1        |

**Resultados.** Se analizaron 100 muestras de cepillados cervicales, se emplearon como controles positivos: un vector plasmídico con el genoma del HPV16 y el DNA de la línea celular Caski y HeLa como control positivo para HPV16 y 18. Los resultados mostraron una alta eficiencia para la genotipificación de las muestras HPV positivas para los tipos 16/18 (Figura A y B). Los picos "melting" obtenidos para la genotipificación del HPV 16 y 18 fueron reproducibles especialmente con el uso de los oligos GP+ (Figuras E, F, G, H e I). No se demostró una eficiente amplificación con el uso de los oligos MY09/11 para el genotipaje del HPV (Figura C y D). Las secuencias de los fragmentos de amplificación para los genotipos virales 16 y 18 fueron evaluados por el programa de análisis de amplimers TM Utility v1.5. El análisis de los amplificados determinó un valor de Tm (°C) específico para cada tipo viral, incluyendo los otros tipos virales que pueden amplificar ambos juegos de primers (MY y GP+).

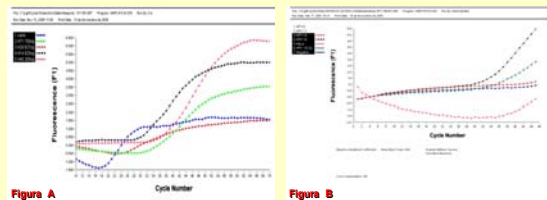


Figura A

Figura B

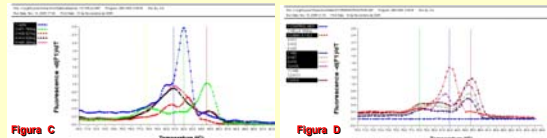


Figura C

Figura D

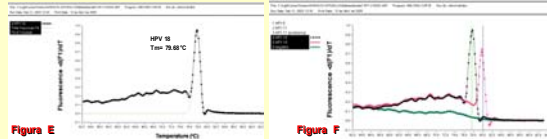


Figura E

Figura F

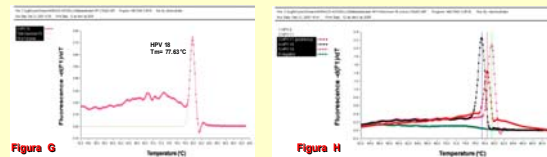


Figura G

Figura H

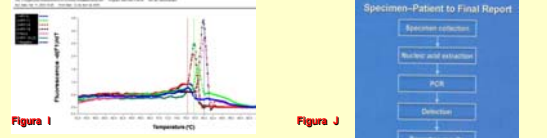
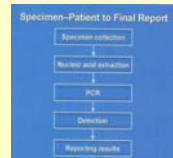


Figura I

Figura J



**Conclusiones.** Con los resultados obtenidos se demostró que la técnica de amplificación del gen L1 del HPV utilizando los oligos GP+ y MY09/11 en la plataforma de PCR tiempo-real es un método sensible, económico y muy rápido para la detección de los genotipos de alto riesgo (HPV 16/18). Los resultados indican que la mejor amplificación se obtiene amplificando con los oligos GP+ (como se demuestra en las figuras E, F, G, H e I). Este método garantiza una prueba de detección de 1 hora para la genotipificación de los HPV de alto riesgo (16/18), la cual podría implementarse en la clínica como un método rápido de monitoreo (Figura J).

**Bibliografía.**

- 1) ParkinDM, Laara E, Muir CS. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. *Int J Cancer* 1988; 41:184-197.
- 2) de Roda Husman AM, WalboomersJM, van den Brule AJ, Meijer CJ, SnijdersPJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995; 76: 1057-1062.
- 3) ReanickRM, Cornelissen MT, Wright DK, Eichinger GH, Fox HS, Ier Schegget J, Manos MM. Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J Natl Cancer Inst.* 1990 Sep 19;82(18):1477-84.