

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Posgrado en Ciencias  
Biológicas**

Facultad de Medicina

**BIOCHIP DE DNA PARA LA DETECCION DE LOS VIRUS DE PAPILOMA  
HUMANO 16 (VARIANTES AA Y E350G), 18, 31, 33, 35, 45, 52 Y 58 EN  
CANCER CERVICAL INVASOR**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTOR (A) EN CIENCIAS**

P R E S E N T A

**M. en C. PATRICIA MENDOZA LORENZO**

DIRECTOR (A) DE TESIS: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS

MÉXICO, D. F.

JUNIO, 2007



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.

## **APOYOS**

Este proyecto fue apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología – Proyectos Sectoriales (7114) y por el Fondo para el Fomento a la Investigación (FOFOI), IMSS.

## **AGRADECIMIENTOS**

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) y al Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) por la beca otorgada durante el desarrollo de la presente investigación.

Agradezco especialmente a mi director de tesis, el Dr. Mauricio Salcedo Vargas su confianza, sus asesorías, su tiempo y todo el apoyo académico y personal recibido a lo largo de mis estudios de posgrado.

Agradezco especialmente a la Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet su interés y su preocupación por sacar adelante el proyecto, su confianza y todas las facilidades brindadas para el adecuado desarrollo de la presente investigación, incluyendo el uso de sus instalaciones y equipo de laboratorio.

Agradezco a todos los miembros del Laboratorio de la Dra. Patricia Ostrosky ubicado en el Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM todo el apoyo y las facilidades otorgadas durante la realización de la presente investigación en especial a la QFB. Monserrat Sordo, a la Dra. Dorys Mata y a la Dra. Ana Maria Salazar.

Agradezco a la QFB. Monserrat Sordo Cedeño por la asesoría técnica recibida durante el desarrollo de este proyecto.

Agradezco a la Dra. Patricia Piña Sánchez por la asesoría técnica recibida durante mis estudios de posgrado y por todo el apoyo académico y personal que siempre me ha brindado.

Agradezco a la Dra. Guelaguetza Vázquez Ortiz todo el apoyo académico y personal recibido durante mis estudios de posgrado.

*Nani*

*¡Mi amor chiquito lindo, te amo!*

Te agradezco todo tu apoyo, tu comprensión y todo el amor que siempre me demuestras.

Gracias por ser una gran hija y una buena persona.

# INDICE

	página
<b>1.0 RESUMEN</b>	1
<b>2.0 ABSTRACT</b>	3
<b>3.0 INTRODUCCION</b>	5
<b>3.1 Virus de papiloma humano (VPH) y cáncer cervical (CC).</b>	5
3.1.1 Nomenclatura de los VPH.	6
3.1.2 Taxonomía del VPH.	6
3.1.3 Estructura básica del genoma del VPH.	8
<b>3.2 Prevalencia de infecciones por VPH en CC.</b>	9
3.2.1 Prevalencia tipo-especifica del VPH en CC.	10
<b>3.3 Incidencia del CC a nivel mundial.</b>	11
3.3.1 Variabilidad genómica del VPH y la incidencia de CC.	12
<b>3.4 Otros factores de riesgo para CC.</b>	12
<b>3.5 Formas de expresión de la infección por VPH.</b>	13
<b>3.6 Estrategias convencionales de detección de VPH.</b>	13
3.6.1 Citología.	13
3.6.2 Técnicas de Hibridación.	14
3.6.3 Captura de Híbridos (HC).	15
3.6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	16
<b>3.7 Innovaciones Tecnológicas: Biochips de DNA.</b>	17
3.7.1 Fundamento básico de los Biochips de DNA.	18
3.7.2 Diseño y fabricación de un Biochip de DNA.	19
3.7.2.1 Tipos de sondas.	19
3.7.2.2 Tipos de soportes.	20
3.7.3 Clasificación de los Biochips de DNA.	22
3.7.4 Tecnologías usadas en la fabricación de Biochips de DNA.	24
3.7.5 Estrategias aplicadas a la detección de la hibridación sobre Biochips de DNA.	24
<b>3.8 Principales aplicaciones de los Biochips de DNA.</b>	26
3.8.1 Identificación de dianas terapéuticas.	26
3.8.2 Descubrimiento y desarrollo de fármacos.	27
3.8.3 Farmacogenética y farmacogenómica.	28
3.8.4 Investigación básica.	28
3.8.5 Diagnóstico clínico.	30
3.8.5.1 Diagnóstico molecular del VPH mediante Biochips de DNA.	31
<b>4.0 JUSTIFICACION</b>	36
<b>5.0 HIPOTESIS</b>	
<b>6.0 OBJETIVO GENERAL</b>	38
<b>6.1 Objetivos particulares</b>	39

<b>7.0 MATERIALES Y METODOS</b>	40
<b>7.1 Líneas celulares y muestras clínicas.</b>	40
<b>7.2 Amplificación de fragmentos del gen L1 de VPH de alto riesgo.</b>	40
7.2.1 Síntesis cíclica de amplificadores provenientes de VPH de alto riesgo mediante PCR.	41
<b>7.3 Características generales del Biochip de DNA para la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC.</b>	42
7.3.1 Características de las sondas.	42
7.3.2 Características del DNA blanco sintético.	43
7.3.3 Características de los oligonucleótidos estabilizadores.	43
<b>7.4 Matriz de soporte para la fabricación de los Biochips de DNA.</b>	44
<b>7.5 Inmovilización de las sondas sobre los Biochips de DNA.</b>	44
<b>7.6 Detección de la hibridación sobre los Biochips de DNA.</b>	47
7.6.1 Soluciones de hibridación.	47
7.6.2 Captura de imágenes sobre los Biochips de DNA.	49
<b>7.7 Herramientas bioinformáticas aplicadas al diseño del Biochip de DNA.</b>	49
<b>7.8 Esquema general de trabajo.</b>	50
<b>8.0 RESULTADOS Y DISCUSION</b>	51
<b>riesgo en CC.</b>	51
8.1.1 Diseño general del Biochip de DNA.	51
8.1.1.1 Obtención del genoma de los VPH de alto riesgo.	52
8.1.1.2 Alineamiento múltiple del genoma de los VPH de alto riesgo.	53
8.1.1.3 Alineamiento múltiple del gen L1 de los VPH de alto riesgo.	57
8.1.1.4 Estrategia de detección de VPH de alto riesgo sobre Biochips de DNA.	61
8.1.1.4.1 Selección de las sondas	65
8.1.1.4.2 Selección del DNA blanco sintético	92
8.1.1.4.3 Selección de los oligonucleótidos estabilizadores.	92
8.1.2 Estandarización del Biochip de DNA.	93
8.1.2.1 Detección de secuencias de DNA blanco de los VPH 16, 18 y 58 sobre los Biochips de DNA a partir del uso de oligonucleótidos virales específicos.	97
8.1.3 Validación del Biochip de DNA.	105
8.1.3.1 Amplificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16 y 18 a partir de las líneas celulares CaSki y SiHa y un DNA positivo para VPH 18.	105
8.1.3.2 Amplificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 a partir de muestras clínicas con CC.	110
8.1.3.3 Detección y tipificación de VPH de alto riesgo a partir de amplificadores virales provenientes de las líneas celulares CaSki y SiHa y de un DNA positivo para VPH 18 sobre los Biochips de DNA.	116
8.1.3.4 Detección y tipificación de VPH de alto riesgo a partir de amplificadores virales provenientes de muestras clínicas con CC sobre los Biochips de DNA.	117
<b>9.0 CONCLUSIONES</b>	126
<b>10.0 LISTA DE FIGURAS</b>	128
<b>11.0 LISTA DE TABLAS</b>	130
<b>12.0 LISTA DE ABREVIATURAS</b>	131
<b>13.0 REFERENCIAS</b>	132
<b>14.0 ANEXO 1</b>	140

## 1.0 RESUMEN

En investigaciones clínicas y epidemiológicas a gran escala los virus de papiloma humano (VPH) 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 39, 51, 73, 68 y 66 son frecuentemente identificados en cáncer cervical (CC). Más del 97 % de estos casos pueden ser atribuibles a los tipos oncogénicos 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35. El enorme potencial que ofrece la detección oportuna de estos VPH en programas de prevención y control de CC, promueve activamente el desarrollo de novedosas herramientas diagnósticas que optimicen su detección. Este trabajo propone el desarrollo de un Biochip de DNA para la detección y tipificación molecular de los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 involucrados en CC. Inicialmente, se implementó un Biochip de DNA compuesto de pequeñas sondas (7-9 bases) que permitieron detectar y discriminar mutaciones en el gen E6 que identifican a las variantes asiático americana (AA) y europea (E) del VPH 16. Este sistema resultó ser muy sensible y específico para la detección de estas variantes sin la necesidad de equipo especializado convirtiéndose en una rentable alternativa para la detección viral. Posteriormente se procedió a evaluar un sistema alternativo en el diagnóstico molecular sobre Biochips de DNA dirigido a la detección y tipificación de virus de papiloma humano de alto riesgo implementado en tres etapas fundamentales: **diseño**, **estandarización** y **validación**. El **diseño** comprendió el análisis y evaluación *virtual* de una serie de secuencias de ADN propuestas para la detección y tipificación de los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 mediante el reconocimiento específico de su secuencia complementaria en el gen L1 viral. En la **estandarización** se evaluó la viabilidad y funcionalidad del diseño previo a partir de pequeños oligonucleótidos (19-188 bases) que simularon la región de interés en el gen L1 de los VPH 16, 18 y 58. Estos ensayos permitieron determinar de manera anticipada la especificidad de las sondas que conforman el Biochip de DNA en la detección y discriminación específica de VPH de alto riesgo, con la posibilidad de optimizar su desempeño previo a la evaluación de las muestras clínicas. La **validación** incluyó la amplificación de fragmentos específicos del gen L1 de los VPH 16 y 18 a partir de las líneas celulares SiHa y Caski usadas como controles positivos para estos tipos virales, además de una

muestra de DNA positivo para VPH 18. Después de hibridar e identificar satisfactoriamente estos amplificados sobre los Biochips de DNA, 91 muestras clínicas de CC fueron sometidas a la amplificación simultánea de los VPH 16, 18 y 58. En 72 de las muestras clínicas fue posible obtener el producto de amplificación esperado (79.1%). De acuerdo con las señales de hibridación sobre los Biochips de DNA, 36 amplificados registraron señales positivas para un solo tipo viral (50%), 28 para más de un tipo viral (38.9%) y 8 no pudieron ser identificadas (11.1%). En general, el tipo 16 fue el más frecuentemente identificado (68%). De las infecciones simples, 29 fueron positivas para el VPH 16 (40.3%), 5 para el VPH 18 (6,9 %) y 2 para el VPH 58 (2.8%). De las infecciones con más de un tipo viral, 21 muestras (29.2%) fueron positivas para 2 de los VPH de alto riesgo: 13 para los VPH 16 y 18 (18.0%), 6 para los VPH 16 y 58 (8.3%) y 2 para los VPH 18 y 58 (2.8%). Siete muestras (9.7%) resultaron positivas para los 3 VPH de alto riesgo analizados (16, 18 y 58). El análisis preliminar de algunas secuencias de los amplificados virales confirman la sensibilidad y especificidad del Biochip de DNA en la detección y tipificación de los VPH 16, 18 y 58. Este Biochip de DNA resultó ser más sensible que otros sistemas de detección viral como la HC2 y mucho más específico, con la ventaja de identificar infecciones con más de un tipo viral. Este sistema representa una poderosa herramienta, factible de aplicar en cualquier laboratorio clínico y de investigación a un costo muy accesible. Su aplicación en el tamizaje primario de lesiones cervicales junto con otras estrategias de diagnóstico convencional como el papanicolaou y la colposcopia podría ser de gran utilidad para reducir la incidencia y mortalidad del CC.



## **2.0 ABSTRACT**

In great scale clinical and epidemiological cervical cancer (CC) studies, the oncogenic human papillomavirus (HPV) types: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 39, 51, 73, 68 and 66 are frequently identified. More of the 97% of the studied cases can be attributable to HPV 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 and 35 types. The great potential that offers the early detection of these HPV types in prevention and CC control trials justifies the development of novel diagnostic tools that could optimize this detection. This work propose the development of a DNA Biochip for the detection and molecular typification of the HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 and 58 widely found in CC. Initially, we applied a sensitive and specific stacking hybridization assay using an oligoarray for the detection of Asian–American (AA) and European (E) (E-350G) HPV 16 variants. The DNA oligoarray was developed in a simple glass slide coated with short capture probes (7-9 mers) specific for AA and E variants. The design of this system successfully discriminated between HPV 16 AA and E variants. This DNA oligoarray show high sensitivity and specificity and also it do not require specialized equipment and could be a reliable technique for HPV 16 detection. In subsequent essays, a alternative system was developed in order to detect high-risk HPV using three basic steps: design, standardization and validation. The design included the analysis and virtual evaluation of a group of DNA sequences proposed for the detection of the HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 and 58 by means of specific recognition of their complementary sequences in the L1 viral gene. During the standardization the viability and functionality of the synthetic capture probes was evaluated using oligonucleotides whose sequences correspond to short regions (19-188 mers) of the L1 gene of HPV 16, 18 y 58. These essays allowed to determine the specificity of the capture probes for the detection of specific high risk HPV types with the possibility of optimizing its performance before to the evaluation of the clinical samples. The validation included the amplification of specific fragments of the HPV 16 and 18 L1 gene from of SiHa and Caski cellular lines, used as positive controls for these viral types, besides of a DNA HPV 18 positive sample. After hybridization and satisfactory identification of the amplicons by the DNA Biochips; 91 CC clinical samples were

submitted to HPV 16, 18 and 58 amplification. In 72 of these clinical samples was possible to amplify the interest viral region (79.1 %). According to the obtained hybridization patterns of the DNA Biochips, 36 amplicons were positive for a single viral infection (50%), 28 for multiple viral infection (38.9%) and 8 were not identified (11.1%). In general, HPV 16 was the more frequently type identified (68%). For the single infections, 29 were positive for HPV 16 (40.3%), 5 for HPV 18 (6.9%) and 2 for HPV 58 (2.8%). About the multiple infections, 21 samples (29.2%) were positives for 2 high-risk HPVs; 13 for HPV 16 and 18 (18%), 6 for HPV 16 and 58 (8.3 %) and 2 for HPV 18 and 58 (2.8 %). Seven samples (9.7 %) were positive for the 3 high-risk HPV types analyzed (16, 18 and 58). The preliminary analysis of the sequences of some viral amplicons confirms the sensibility and especificity of the DNA Biochip for the detection and typification of the HPV 16, 18 and 58 types. This DNA Biochip turned out to be more sensitive and more specific than other systems of viral detection such as the HC2, with the advantage of identifying infections with more of one viral type. This system represents a powerful tool, feasible of to apply in investigation and any clinical laboratory to an accessible cost. Its application in the primary triage of cervical lesions together with other strategies of conventional diagnosis, like the papanicolaou and colposcopy, might be of great usefulness to reduce the incidence and mortality of CC.

### 3.0 INTRODUCCION

#### 3.1 *Virus de papiloma humano (VPH) y cáncer cervical (CC).*

A nivel mundial, los tumores genitales femeninos (sin incluir el cáncer de mama) abarcan a la gran mayoría de los tumores de la mujer. De estos tumores el cáncer cervical (CC) es uno de los más frecuentes (12%) donde la mitad de los casos fallecen a causa de la enfermedad. El CC es considerada la segunda neoplasia más común en todo el mundo con 471 000 nuevos casos y 288 000 muertes reportadas anualmente. Cerca del 80% de estas muertes son registradas en países en desarrollo, donde la mayoría de las mujeres no tienen acceso a programas de prevención y tratamiento efectivos [1].

Las investigaciones clínicas y epidemiológicas de las últimas décadas confirman la relación etiológica entre la infección por ciertos tipos de virus de papiloma humano (VPH) y el desarrollo de CC y sus lesiones precursoras [1-6]. Se ha estimado que del 2 al 20 % de la población femenina mundial es portadora oculta de VPH en el cuello uterino y que bajo ciertas condiciones estas infecciones pueden convertirse en persistentes con capacidad de inducir e incrementar el riesgo de CC [2, 7]. Estos antecedentes colocan al CC como prioridad dentro de los principales programas de control de cáncer a nivel mundial, al ser considerado un problema de salud pública que potencialmente puede evitarse mediante estrategias de detección temprana de la enfermedad y tratamientos más adecuados.

Aunque la infección por VPH es muy común entre la población, en la mayoría de los casos son benignas y los individuos afectados son capaces de eliminarlas por si solos en periodos que pueden ir de seis meses a un año; solo una pequeña fracción de las personas infectadas, conocidas como portadores crónicos o persistentes pueden retener el virus durante largos periodos de tiempo (incluso por décadas) y desarrollar posteriormente algún tipo de lesión [8]. Según datos actuales, se ha podido detectar DNA de VPH en más del 95 % de los casos con CC comparado con el 5 al 20 % de los casos identificados como grupos control [9-11].

En un principio las infecciones por VPH pueden dar origen a lesiones de bajo grado o LGSIL (Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion) llamadas displasias (término usado para describir células anormales) las cuales al no poder ser eliminadas por el sistema inmune del hospedero pueden progresar a lesiones de alto grado o HGSIL (High Grade Squamous Intraepithelial Lesion) o CC (en su mayoría carcinomas de células escamosas, ya que los adenocarcinomas suelen ser menos frecuentes). También pueden surgir alteraciones denominadas ASCUS (Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance) donde las células no parecen completamente normales, en ocasiones a consecuencia de infecciones por VPH.

Las infecciones por VPH también han sido asociadas al desarrollo de otros tipos de cáncer en el tracto anogenital como: tumores del canal anal, donde la presencia de VPH de alto riesgo es muy importante; tumores de vulva, cuya fracción de casos atribuible al VPH oscila entre el 30 y el 70 %; el cáncer de vagina, donde se han identificado marcadores virales entre el 40 y el 50 % de los casos; el cáncer de pene con presencia de VPH entre el 70 y el 80 % de los casos (las estimaciones para vagina y pene se basan por lo general en pocos casos, con tecnología de detección viral variable y sin los controles adecuados en la mayoría de los casos). Recientemente las infecciones por VPH también se han asociado con lesiones en partes no-anogenitales como el cáncer de piel y el de cabeza y cuello (cavidad oral, nariz, naso-faringe, oro-faringe, laringe, etc.) [12-14].

### **3.1.1 Nomenclatura de los VPH.**

Desde su descripción los virus de papiloma se han identificado por las siglas PV (del inglés *papillomaviruses*) y una o dos letras que indican la especie hospedera, así los que infectan al humano se designan como VPH (en inglés *human papillomaviruses* ó HPV). Cuando un VPH es identificado se le asigna un número en la secuencia histórica de su descripción (ejemplo HPV-1, HPV-2, etc.), proceso que durante los últimos 20 años ha integrado el Reference Center for Papillomaviruses del German Cancer Research Center. Actualmente se considera que aparece un “nuevo” tipo viral cuando se determina la secuencia total del genoma aislado y se demuestra que esta contiene al menos el 10 % de diferencias en la secuencia de nucleótidos de su gen L1 con respecto a todos los tipos de VPH ya conocidos. También se pueden incluir subtipos y variantes virales cuando existe una variación menor al 10 % en la secuencia del gen L1 con respecto a un tipo viral ya conocido. En un principio el término “*subtipo*” fue usado para identificar aislados específicos de un tipo viral con patrones de restricción, divergentes, actualmente este término hace referencia a aislados cuya variación en el gen L1 difiere entre un 2 y un 10 % con respecto a algún tipo viral conocido. Una “*variante*” es reconocida cuando existe una variación en su secuencia menor al 2 % con respecto al aislado original conocido como prototipo o secuencia de referencia, estos cambios pueden ser tan sutiles como la sustitución de un simple nucleótido en una región particular del genoma por ejemplo en el gen E6 o en el LCR (long control region). La gran divergencia identificada a la fecha entre los tipos y variantes virales en las diferentes poblaciones estudiadas sugiere diferencias en sus propiedades biológicas y de patogenicidad [15, 16].

### **3.1.2 Taxonomía de los VPH.**

Después de las primeras investigaciones realizadas por Harold zur Hausen en 1976 y 1981 las cuales establecen una clara asociación entre VPH y CC se han identificado cerca de 200 tipos virales. De ellos solo 118 han sido aislados, completamente secuenciados y clasificados de acuerdo con su nicho biológico, su

potencial oncogénico y su posición filogenética. El resto solo ha sido parcialmente caracterizado [15-17].

Esta diversidad llevó al International Council on Taxonomy of Viruses (ICTV) a una nueva reclasificación taxonómica que actualmente agrupa a estos virus dentro de la gran familia *papillomaviridae*, un *taxa* separado de la familia *papovaviridae* donde previamente eran incluidos. La familia *papillomaviridae* incluye al género *Alfa-papillomavirus* considerado el de mayor relevancia clínica por incluir todos los VPH asociados a lesiones genitales y mucosas. Según datos derivados de estudios de casos y controles donde se ha evaluado la asociación entre infecciones por VPH y CC, al menos 40 VPH son capaces de infectar el tracto genital humano. De ellos, los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82 son considerados como “tipos oncogénicos o de alto riesgo” por su fuerte asociación con la progresión hacia HGSIL y CC. Otros más, como los tipos 26, 53 y 66 son considerados como probables oncogénicos. Los tipos 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81 son considerados como de “bajo riesgo” debido a que generalmente son relacionados con lesiones benignas de epitelios y mucosas ó LGSIL, solo los tipos 34, 57 y 83 son considerados como de riesgo aún no determinado [8-19] (Ver Tabla 1).

Tabla 1. Virus de papiloma humano (VPH) frecuentemente asociados con LGSIL, HGSIL y CC (Modificada de Bernard, 2005).

<b>Familia: <i>Papillomaviridae</i></b>				
<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Tipo</b>	<b>Riesgo</b>	
<i>Alfa-papillomaviruses</i>	7 y 9	HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 39, HPV 45, HPV 51, HPV 52, HPV 56, HPV 58, HPV 59, HPV 68, HPV 73, HPV 82	ALTO (CC/HGSIL)	
		HPV 26, HPV 53 y HPV 66	ALTO (CC/HGSIL) (probables)	
	8 y 10	HPV 6, HPV 11, HPV 40, HPV 42, HPV 43, HPV 44, HPV 54, HPV 61, HPV 70, HPV 72, HPV 81	BAJO (LGSIL)	
		HPV 34, HPV 57, HPV 83	NO DETERMINADO	

Los virus de papiloma fueron recientemente reconocidos por el International Council on the Taxonomy of Viruses (ICTV) como una familia de virus independientes.

### **3.1.3 Estructura básica del genoma del VPH.**

El genoma de los papilomavirus abarca cerca de 8 kb de DNA circular de doble cadena que comprende varios genes u “open reading frames” (ORF): 8 genes de expresión temprana o “early” (E1, E2, E4, E5, E6, E7 y E8) cuya expresión se traduce en proteínas implicadas en la regulación, replicación, transcripción y transformación viral y 2 genes de expresión tardía o “late” (L1 y L2) cuya expresión genera las proteínas responsables de la formación de la cápside y la maduración viral. También incluye una región de control denominada LCR o “long control region” encargada de controlar la expresión de los genes tempranos E6 y E7 [1-19]. Los genes de expresión temprana difieren notablemente en su secuencia entre los diferentes tipos de VPH, mientras que los genes de expresión tardía presentan notables similitudes entre ellos (Ver Figura 1).

La baja replicación del genoma del VPH, casi siempre en sincronía con la replicación de las células epiteliales del hospedero (más o menos 10-100 por año) y la ausencia de recombinación entre- e intra-tipo limitan su diversificación, aunque se ha reportado cierta variabilidad en su genoma a consecuencia de mutaciones puntuales, deleciones e inserciones, justo como aquellas de sus hospederos. Estos cambios pueden ocurrir fortuitamente y pueden llegar a ser establecidos en una población si favorecen positivamente algún mecanismo viral o cuando son funcionalmente neutrales. Esta inherente estabilidad del genoma del VPH los convierte en un modelo ideal para el análisis de sus secuencias de nucleótidos y aminoácidos [17].

Los análisis realizados a las primeras bases de datos disponibles con las secuencias de los VPH mostraron que el gen L1, el cual codifica para la proteína mayor de la cápside, es de los más conservados y por ello es el más adecuado para construir la taxonomía de la familia. Otros genes como E6 y el LCR también han sido usados para su clasificación llevando a asociaciones taxonómicas similares pero no idénticas. Esta característica convierte a estos genes, especialmente a L1, en la diana principal de la detección de DNAs virales por métodos “consenso” al contrario de la detección “tipo específica” que utilizará genes con alta variabilidad intratipo como E6 y E7 [19]. Actualmente, la taxonomía oficial del VPH solo es aceptada si se realiza sobre la base de la comparación de la secuencia de nucleótidos del gen L1 [17, 18].

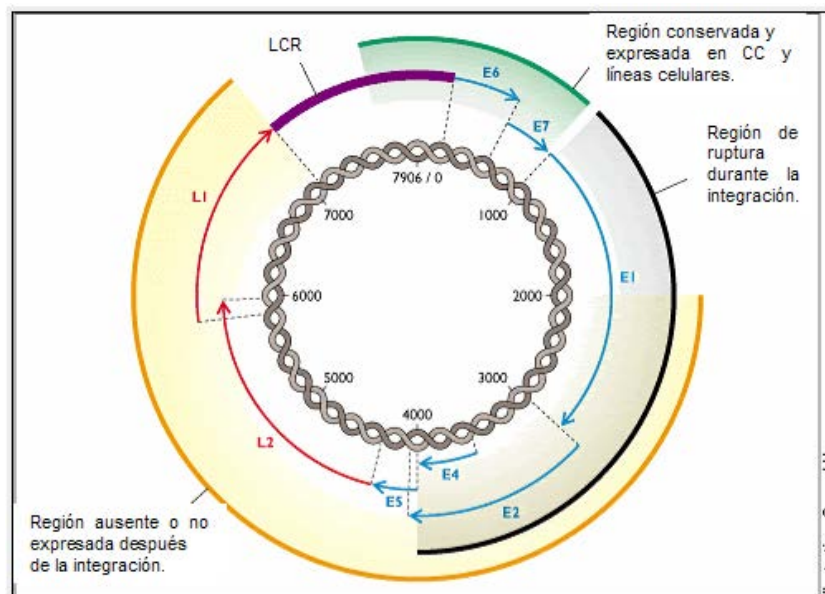


Figura 1. Genoma del virus de papiloma humano. Las 8 kb del genoma de DNA de doble cadena comprenden tres regiones: la región control (LCR) encargada de regular la expresión de los genes tempranos (principalmente E6 y E7), una región con genes de expresión temprana (E1 a E8) involucrados en la replicación, transcripción y transformación viral y otra con genes de expresión tardía (L1 y L2) responsables de la formación de la cápside y la maduración viral. (Tomada de Burk, R., 1999).

### 3.2 Prevalencia de infecciones por VPH en CC.

Se ha documentado una prevalencia del 2 al 44% de infecciones por VPH en poblaciones de mujeres alrededor del mundo, una variación que puede ser explicada por diferencias en los rangos de edad de la población analizada y en la sensibilidad de los métodos de detección viral utilizados [10]. En pacientes con CC, los estudios epidemiológicos indican una prevalencia global de infecciones por VPH superior al 96 %. Estos datos son apoyados por estudios basados en análisis de DNA viral y anticuerpos específicos contra antígenos de la cápside que reportan que la mayoría de las mujeres sexualmente activas (>50 %) han sido infectadas con uno o más tipos de VPH en algún momento de sus vidas [21].

En estudios de asociación entre la edad de los pacientes y la prevalencia de infecciones por VPH se reporta una incidencia alta en jóvenes y baja en adultos, mientras que la tasa de incidencia de CC parece ser baja en jóvenes y creciente a partir de los 30-35 años de edad [2, 8]. El índice prevalencia de VPH / incidencia de cáncer sugiere que, a nivel poblacional, el período de inducción entre la exposición al VPH y el CC es de aproximadamente unos 10 a 15 años, y que son las portadoras crónicas de una infección por VPH (adquirida probablemente en la juventud) las que constituyen el grupo de alto riesgo para desarrollar cáncer [8] (Ver Figura 2).

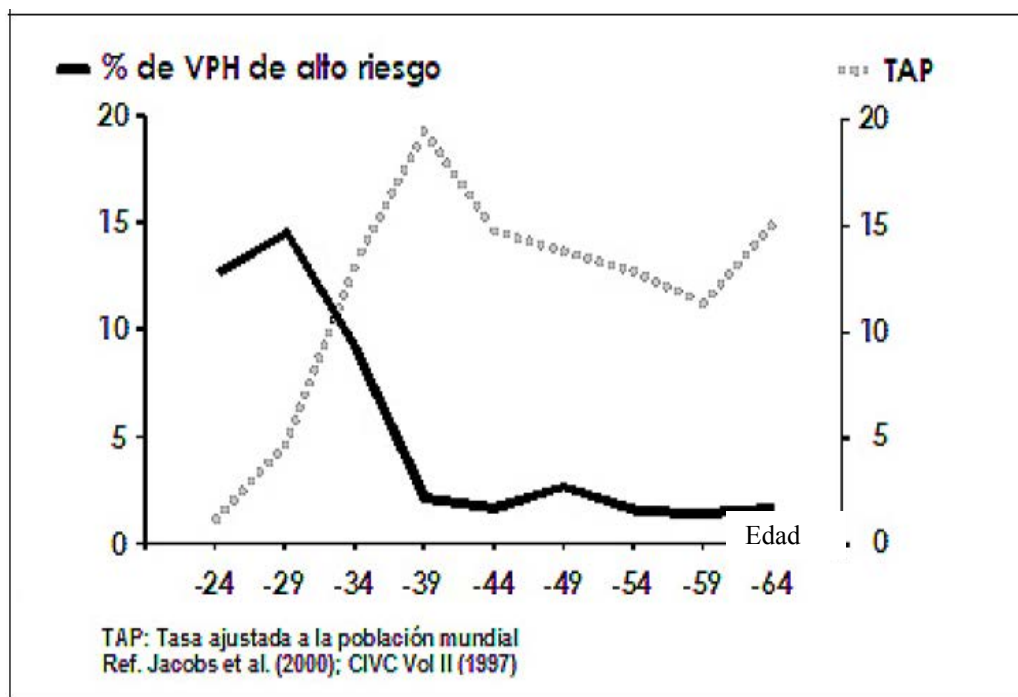


Figura 2. Relación entre prevalencia del virus de papiloma humano e incidencia de cáncer cervical según la edad (Tomada de Documentos de consenso: La infección por papilomavirus, 2002).

### 3.2.1 Prevalencia tipo-específica del VPH en CC.

Al parecer, la frecuencia de infecciones con tipos de VPH de alto riesgo entre mujeres sexualmente activas parece ser mayor a la reportada con tipos de bajo riesgo [8]. En general, una infección por VPH de alto riesgo registra una duración media de 8 a 16 meses, mientras que para los VPH de bajo riesgo es alrededor de 5 meses [22].

Para evaluar la distribución geográfica de los tipos de VPH asociados al CC se han realizado grandes estudios epidemiológicos coordinados por la International Agency for Research on Cancer (IARC) los cuales incluyen la participación de varios países en todo el mundo abarcando un gran número de casos. Según estas investigaciones alrededor de 30 tipos de VPH fueron identificados, las infecciones con un solo tipo de VPH se detectaron hasta en el 92.2 % de los casos y las infecciones con más de un tipo viral fueron registradas hasta en un 7.8 %. Los tipos de VPH identificados con mayor frecuencia fueron en orden descendente el 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 39, 51, 73, 68 y 66, en el caso de coinfecciones el 71 % resulto positiva para los tipos 16 y 18 [1-11, 21, 23]. Según las estadísticas hasta el 88 % de los casos con CC en todo el mundo (con más de 10 000 muestras analizadas) pueden ser una consecuencia de infecciones por al menos 8 tipos de VPH (16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35) [5-11, 21, 23] (Ver Tabla 2).



Tabla 2. Tipos de VPH frecuentemente identificados en CC a nivel mundial según la IARC\* (Modificada de Muñoz, 2004).

INFECCIONES SIMPLES		INFECCIONES MÚLTIPLES	
<i>Tipo VPH</i>	%	<i>Tipo VPH</i>	%
16	50 -70	16 - 18	1.76
18	8 - 23	16 - 33	0.41
45	6.8	16 - 31	0.26
31	4.3	16 - 45	0.19
33	3.7	16 - 51	0.15
52	2.5	16 - 58	0.11
58	2.3	16, otros	0.64
35	2.2	18 - 45	0.71
59	1.5	18 - 33	0.19
56	1.3	18 - 52	0.11
39	1.2	18, otros	0.41
51	1.1	31 - 33	0.11
73	0.6	31, otros	0.19
68	0.5	33 - 35	0.41
66	0.5	33 - 58	0.34
otros	6.3	45, otros	0.37

\*IARC = Internatinal Agency for Research on Cancer

### 3.3 Incidencia del CC a nivel mundial.

En los últimos años el CC ha ocupado los primeros lugares en incidencia y mortalidad en muchas partes del mundo llegando a ocupar el primer lugar en la mayoría de los países en desarrollo donde se han registrado hasta el 80 % del total de los casos [24, 25]. En países desarrollados la incidencia de esta enfermedad ha disminuido debido a la implementación de programas efectivos de detección oportuna de lesiones precancerosas (hasta en un 80 % durante los últimos 50 años) [24, 25]. De acuerdo con los últimos registros la incidencia global estimada para el CC es de 470 000 casos por año y aproximadamente 233 000 muertes (11 casos por cada 100 000 mujeres en países desarrollados, 44 casos por cada 100 000 mujeres en países en desarrollo [10, 24, 25]. México es considerado uno de los países con la mayor incidencia de CC (40 a 50 casos por cada 100 000 mujeres) en comparación con países como EUA o Europa cuya incidencia es relativamente baja (11 casos por cada 100 000 mujeres) [7, 24-28].

### **3.3.1 Variabilidad genómica del VPH y la incidencia de CC.**

Datos epidemiológicos a nivel mundial sugieren que variaciones en el genoma de los VPH representan un factor que puede modificar su potencial oncogénico y tener un impacto directo en la incidencia de CC [4-7]. Entre los aspectos que pueden favorecer la transformación viral maligna se encuentran variaciones en la secuencia de las proteínas virales E6 y E7 capaces de interactuar con proteínas reguladoras del ciclo celular como p53 y pRb y alterar sus funciones.

Los VPH 16 y 18 registran la mayor variabilidad genómica que ha sido reportada a la cual es factible atribuir su elevado potencial oncogénico [4-7, 28]. Al menos cinco variantes virales son bien reconocidas para el VPH 16; la asiático americana (AA), la europea (E), la africana (Af), la asiática (As) y la norteamericana (NA), mientras que para el VPH tipo 18 son tres las reportadas; la asiático americana (AA), la europea (E) y la africana (Af). Un dato interesante es que entre las regiones geográficas con una alta prevalencia de las variantes AA y Af de los VPH 16 y 18 se ubican los países con la mayor incidencia de cáncer anogenital (en su mayoría países de Latinoamérica, África y algunos de Asia) [29]. En México también se ha relacionado la alta incidencia de CC con la frecuencia de infecciones por HPV 16 (50-70%), siendo sus variantes asiático americana (AA) y Europea (E350G) identificadas con mayor frecuencia. La variante E ha sido preferencialmente detectada en HGSIL (33%) y CC (24%), mientras que la variante AA solo ha sido identificada en CC, lo que sugiere un mayor potencial oncogénico para esta variante [26, 30-32].

### **3.4 Otros factores de riesgo para CC.**

A pesar de que se considere al VPH como la causa necesaria de prácticamente todos los casos de CC, no todas las mujeres infectadas por VPH de alto riesgo desarrollan CC o sus lesiones precursoras. De hecho, es bien conocido clínica y epidemiológicamente que la gran mayoría de mujeres infectadas eliminan espontáneamente su infección, siendo sólo una pequeña fracción las que experimentan una persistencia (frecuentemente subclínica) que las pondrá en un mayor riesgo de progresión neoplásica. De esta manera, a pesar de que una infección persistente por VPH es una causa necesaria para la progresión neoplásica, no es una causa suficiente para el desarrollo de la misma. Por lo tanto, si sólo algunas mujeres infectadas progresan a HSIL o CC probablemente existen otros factores - o co-factores - que al interactuar con el VPH modulan el riesgo de progresión.

A la fecha se han descrito co-factores **virales**, genéticos y relacionados con la conducta de la mujer o medioambientales. Dentro de los determinantes virales de progresión se incluyen: el tipo viral, la carga viral, las variantes filogenéticas, la integración con el DNA celular y la probabilidad independiente de progresión asociada a cada tipo o variante viral. Los cofactores **genéticos** incluyen marcadores de susceptibilidad genética y los factores que regulan la respuesta

inmunitaria celular y humoral a la infección por el VPH, como el HLA y p53. Los principales co-factores de progresión **medioambientales** identificados en estudios epidemiológicos son: el tabaco, el uso prolongado de anticonceptivos orales y una alta paridad (muchos hijos). El tabaco tiene una acción moderada multiplicando aproximadamente por 2 el riesgo de progresión neoplásica en la mujer infectada. Asimismo, el uso prolongado de los anticonceptivos orales también puede favorecer de la persistencia de VPH y la progresión neoplásica. Este hallazgo, sumado al efecto de la paridad, observado en algunos estudios epidemiológicos, sugiere que el ambiente hormonal endógeno y exógeno puede modular el riesgo de progresión desde infección viral hasta HGSIL y carcinoma invasor. Otros co-factores descritos son la infección por *Chlamydia trachomatis* y HSV-2, probablemente debido a la cervicitis crónica. La inmunodepresión inherente a la co-infección por VIH es un factor determinante de progresión neoplásica [1-22]. Del conjunto de riesgos resultantes de estos co-factores probablemente depende el riesgo global de persistencia del VPH, requisito necesario en la carcinogénesis cervical, y por lo tanto del riesgo real para que una mujer infectada desarrolle algún tipo de lesión cervical y eventualmente cáncer.

### **3.5 Formas de expresión de la infección por VPH.**

La infección por VPH se puede expresar en forma clínica, subclínica o latente. La manifestación **clínica** habitual de la infección son los condilomas acuminados, verrugas genitales, papilomas venéreos o verrugas venéreas. La infección **subclínica** por VPH es de gran importancia, ya que al no ser aparentes las lesiones, se facilita el contagio. Las lesiones pueden identificarse mediante visualizaciones colposcópicas tras la aplicación de ácido acético, siendo en general aplanadas y múltiples. La infección **latente**, sin evidencia clínica ni histológica, sólo es posible detectarla con métodos moleculares de determinación de DNA o proteínas virales [1, 2].

### **3.6 Estrategias convencionales de detección de VPH.**

#### **3.6.1 Citología.**

El gran número de VPH asociados a enfermedades y al ser considerados el mayor factor de riesgo en el desarrollo de CC ha impulsado el desarrollo de estrategias que faciliten su detección. El primer método enfocado a la detección de lesiones cervicales fue la tinción de papanicolau (Pap test) introducido por el patólogo George Papanicolau en 1949 antes de que la causa del CC fuera reconocida. El Pap test ha sido de gran utilidad en la detección de anomalías celulares que puedan indicar algún tipo de lesión cervical (en su mayoría a consecuencia de infecciones por VPH) y ha contribuido de manera importante a reducir la incidencia de CC y su tasa de mortalidad en muchas partes del mundo, aunque generalmente solo ha podido ser aplicada con éxito en países desarrollados donde

se cuenta con la infraestructura, los recursos necesarios y el personal calificado para poder realizar este tipo de pruebas. De aquí la necesidad de implementar estrategias factibles de aplicar en todos los demás países donde hoy en día se reportan la mayor parte de los casos con CC.

El Pap test continua siendo aplicado en programas masivos de detección, manejo y prevención del CC, sin embargo su eficiencia ha sido ampliamente cuestionada. Aunque los cambios morfológicos asociados a infecciones por VPH son bastantes característicos, el Pap test no puede pronosticar con precisión la presencia viral en base a la morfología de una lesión, además existe una falta de consenso sobre su sensibilidad para detectar lesiones precursoras de CC (entre 51 y 65%), según investigaciones multi-céntricas realizadas a nivel mundial [33]. La baja sensibilidad del Pap test es considerada su mayor limitación y una consecuencia directa de la falta de objetividad en el diagnóstico, resultado de la falta de personal calificado e inadecuadas estrategias en la toma y conservación de las muestras que originan un elevado número de falsos negativos (15-45 %) y falsos positivos (5-15 %) [34]. Datos epidemiológicos indican que es posible que el 60 % de los casos de CC estén asociados con ausentes o deficientes programas de prevención y manejo de la infección [33].

La baja eficiencia de la citología en la detección de lesiones precursoras de CC y en el manejo de pacientes con ASCUS favoreció la aplicación de herramientas alternativas para la detección de VPH. En un principio, la detección inmunohistoquímica de antígenos vírales (proteínas estructurales L1 y L2) con anticuerpos mono o policlonales fue una herramienta de diagnóstico viable en la búsqueda de infecciones por VPH en biopsias, sin embargo se vio limitada debido a que solo el 50 % de las lesiones características de infecciones por VPH dan una señal positiva (casos donde los antígenos virales eran expresados), mientras que las infecciones latentes o subclínicas no pueden ser detectadas [9].

### **3.6.2 Técnicas de Hibridación.**

Con el auge de las técnicas de biología molecular enfocadas al diagnóstico preciso de enfermedades durante las últimas décadas, surgieron novedosas estrategias de detección y tipificación de VPH. Las primeras herramientas que facilitaron la detección de VPH en exudados cervicales y biopsias fueron la hibridación *in situ* (ISH) y el Southern blot, basadas en la hibridación de ácidos nucleicos. Ambas metodologías involucran el uso de sondas marcadas dirigidas contra el DNA viral, solo que en la ISH es posible visualizar en el tejido cervical la presencia intracelular de secuencias vírales, mientras que en el Southern blot la detección viral requiere el aislamiento previo del DNA de la muestra. Durante años estas herramientas resultaron de gran utilidad en análisis genómicos tempranos del VPH, sin embargo su baja sensibilidad, su laboriosidad y la relativamente gran cantidad de DNA que requieren ha dificultado su aplicación en investigación y en programas masivos de detección de CC y sus lesiones precursoras [9, 35].

### **3.6.3 Captura de Híbridos (HC).**

Los avances tecnológicos y la importancia de un diagnóstico de infecciones por VPH más eficiente en programas de prevención, detección y manejo del CC ha impulsado el desarrollo de sistemas de detección viral más sensibles y específicos. Debemos entender por sensibilidad el límite de detección o la más baja cantidad del DNA que podemos identificar en un ensayo y por especificidad el nivel de precisión del ensayo, entre menor sea el número de falsos positivos y falsos negativos mayor es la precisión de la prueba [35].

Entre los sistemas que lograron incrementar la sensibilidad de detección del VPH resalta la Captura de Híbridos de primera y segunda generación (HC1 y HC2) comercializadas por Digene Corporations, Gaithers-burg, Md. La HC1 fue la primer prueba de detección de VPH aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para la detección de HGSIL y CC pero fue rápidamente sustituida por la HC2 quien ofreció una mayor sensibilidad analítica (entre 6.6 y 17.6 pg/ml dependiendo del tipo de VPH) y un equipo de detección viral más eficiente [9].

En la HC2 el DNA proveniente de los pacientes es primero desnaturalizado y mezclado con un grupo de sondas de RNA contenidas en un tubo con solución de hibridación. Este sistema de detección viral incluye dos grupos de sondas de RNA que pueden ser utilizadas de manera simultánea o por separado. El primero o grupo A reconoce tipos virales de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44) y el segundo o grupo B reconoce tipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 y 68). Si la muestra es positiva para VPH, el DNA viral y el grupo de sondas de RNA producen híbridos DNA-RNA. Estos complejos DNA-RNA son inmovilizados dentro de viales cargados con anticuerpos que reconocen a estos híbridos. Los híbridos inmovilizados son reconocidos por un segundo grupo de anticuerpos anti-DNA/RNA marcados con moléculas de fosfatasa alcalina, como múltiples moléculas son conjugadas a cada anticuerpo y múltiples anticuerpos reconocen a cada híbrido se da una substancial amplificación de señal. Después de una serie de reacciones se produce un producto luminiscente que puede ser cuantificado como unidades relativas de luz por un luminómetro, estas unidades de luz son proporcionales a la cantidad de DNA viral presente en la muestra [22, 36].

En diversos estudios se resalta la gran sensibilidad (68-95 %) y reproducibilidad de la HC2 comparada con herramientas como la citología, sin embargo las hibridaciones inespecíficas reportadas entre el grupo de sondas de RNA y los VPH contemplados (16, 31, 33, 35, 6, 11, 44, etc.) y no contemplados (53, 66, 67) le restan especificidad a la prueba y aunque la HC2 es capaz de detectar infecciones por VPH de alto y bajo riesgo, no permite diferenciar entre ellos a un tipo viral en específico lo que hace necesaria la aplicación de otras herramientas de tipificación viral, como la secuenciación [9, 19, 35]. Es importante señalar que aunque esta prueba es capaz de cuantificar la carga viral, esta no se puede corregir en función del número de células existentes en la muestra y dado que solo detecta un grupo de genotipos virales y no el genotipo exacto, la detección de cargas virales altas puede ser el resultado de una infección con participación de múltiples tipos de

VPH presentes en la muestra. En la actualidad este tipo de proceso exige equipo, que comprende desde suministros básicos de laboratorio hasta equipo tecnológicamente avanzado, condiciones que hacen que el uso de la HC2 sea demasiado costoso y difícil de aplicar en muchos establecimientos de bajos recursos.

Recientemente fue introducida la HC3 y virtualmente promete incrementar la especificidad de detección y discriminación de secuencias virales [19, 37, 38]. Este sistema al igual que su antecesor, la HC2, involucra la formación de híbridos entre el DNA del VPH y las sondas de RNA que reconocen la secuencia de 13 diferentes genotipos de VPH (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) durante la etapa de hibridación. Una de las diferencias técnicas entre la HC3 y la HC2, es que la HC3 emplea oligonucleótidos de DNA biotinilado para la captura de los complejos DNA-RNA en viales cargados con estreptavidina, mientras que la HC2 emplea viales cargados con anticuerpos. En investigaciones preliminares donde se compara el desempeño de la HC3 frente a la HC2 para detectar HGSIL y CC se reporta que la HC3 puede ser mas sensible e igualmente específica que la HC2 en la detección de HGSIL en mujeres mayores de 30 años con antecedentes de citología negativa por pruebas de papanicolau convencionales, aunque es necesario un mayor número de estudios para validar la prueba [39].

#### **3.6.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Una de las herramientas que revolucionó el análisis de los ácidos nucleicos es la reacción en cadena de la polimerasa ó PCR (del ingles *Polymerase Chain Reaction*) considerado el método de amplificación selectiva más sensible, específico y flexible que ha sido desarrollado. Este tipo de tecnología puede ser usada para detección simple y múltiple, cuantificación de la carga viral, secuenciación de DNA y análisis de mutaciones. La PCR logró incrementar la sensibilidad y especificidad de detección de VPH ofrecida por pruebas de diagnóstico anteriores. Un simple ensayo de PCR es capaz de detectar de 10 a 200 copias de VPH por muestra (aunque depende del tipo viral) y amplificar fragmentos específicos de manera exponencial y reproducible.

Esta versatilidad le ha permitido experimentar diversas modificaciones enfocadas a mejorar su potencial de detección. La *PCR-tipo específica* fue la primer herramienta de amplificación capaz de identificar con precisión un solo tipo de VPH, sin embargo su eficiencia se vio limitada en muestras con infecciones múltiples donde es necesario realizar varias amplificaciones, un hecho que podría resultar laborioso y caro. Una alternativa a esta limitante fue la aparición de la *PCR-general ó PCR-consenso* la cual facilita la detección simultánea de un amplio número de VPH en una misma reacción de amplificación mediante el uso de iniciadores modificados. La *PCR-consenso* ha sido usada durante años para amplificar una región muy conservada dentro del gen L1 de un amplio número de VPH, entre los primeros iniciadores utilizados con este fin destacan los MY09/11 y su versión mejorada los PGMY09/11 que detectan y reproducen de manera

eficiente un fragmento de 450 pares de bases, posteriormente surgieron los iniciadores GP5/GP6 y su versión mejorada los GP5+/GP6+ que han demostrado ser muy sensibles en la detección de un fragmento viral de 150 pares de bases comprendido dentro del fragmento de amplificación de los MY09/11 [9, 19, 37, 40, 41]. Entre otras modificaciones descritas a la PCR para el diagnóstico del VPH está la *PCR en Tiempo Real* que permite detectar y determinar la carga viral, aspectos que facilitan la correlación entre el número de copias de ciertos tipos virales y el riesgo de desarrollar lesiones cervicales asociadas a ellos y la *PCR de Transcripción Reversa ó RT-PCR* que hace posible identificar la expresión de oncogenes vírales de relevancia clínica.

La versatilidad de la PCR en la detección de secuencias genéticas esta bien documentada, aunque se ha reportado que su eficiencia puede verse afectada por procedimientos inadecuados durante la extracción de DNA, contaminación de la muestra, uso de diferentes DNA polimerasas, el diseño inadecuado de iniciadores o al modificar el tamaño del producto de amplificación. Además todos los productos amplificados tienen que ser posteriormente analizados por técnicas adicionales como secuenciación, análisis de restricción e hibridación con sondas específicas, aspectos que incrementan los tiempos y los costos de procesamientos de las muestras [35, 37, 39, 40].

Aún con sus limitaciones, las técnicas moleculares dirigidas a la detección de VPH ofrecen un enorme potencial si son aplicados adecuadamente en programas de prevención y control del CC ya que facilitan la identificación de mujeres con un mayor riesgo de padecer la enfermedad. Con la identificación de pacientes en riesgo y su oportuna intervención muy probablemente se podría disminuir la incidencia y mortalidad por CC. Además se evitarían tratamientos e intervenciones innecesarias que tendrían un impacto directo en la calidad de los servicios de salud.

### **3.7 Innovaciones Tecnológicas: Biochips de DNA.**

El éxito de proyectos como la secuenciación del genoma humano es el resultado de una constante innovación tecnológica, capaz de generar una enorme cantidad de información y novedosas herramientas para procesarla. En este contexto, las técnicas moleculares han experimentado un impulso tecnológico determinante en la investigación del cáncer con importantes consecuencias clínicas en cuanto al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de los pacientes. En apenas una década se ha pasado de trabajos basados en el estudio de uno o pocos genes al análisis de genomas en su totalidad. La aplicación más conocida y probablemente la que está generando más datos en estos momentos es la técnica de hibridación mediante arreglos (*arrays*), *Microarreglos (DNA Microarrays)* o *Biochips de DNA (DNA Biochips)*, una herramienta que permite realizar diversos análisis genéticos basados en la miniaturización de procesos biológicos.

En biología molecular el término “biochip” describe pequeños dispositivos (chip) que contienen material biológico (bio) empleados para la obtención de una gran cantidad de información biológica en un simple ensayo. El término biochips describe dispositivos en los que se alcanza una elevada densidad de integración de material biológico inmovilizado de forma regular, ordenada y conocida sobre una superficie sólida. Este tipo de disposición permite conocer la posición exacta del material biológico inmovilizado.

### 3.7.1 Fundamento básico de los Biochips de DNA.

Un Biochip de DNA representa un gran número de moléculas de DNA denominadas “sondas” inmovilizadas sobre un sustrato sólido formando una matriz de secuencias en dos dimensiones. Las sondas pueden ser cortas como los oligonucleótidos, o de mayor tamaño como el cDNA (DNA complementario, sintetizado a partir de mRNA) y los productos de PCR (replicación *in vitro* de secuencias de DNA mediante PCR). En estos dispositivos los ácidos nucleicos (DNA para genotipificación o RNA para análisis de expresión génica) se marcan por diversos métodos (enzimáticos, fluorescentes, etc.) y se incuban sobre la matriz de sondas permitiendo la hibridación (reconocimiento y unión) de secuencias complementarias. Durante la hibridación, las muestras de material genético marcadas, se unirán a sus sondas complementarias sobre el biochip. El DNA que no hibrida o que hibrida inespecíficamente es eliminado durante las etapas de lavados. Después del proceso de hibridación, cada imagen es captada mediante un escáner y sometida a procesos de digitalización, normalización y cuantificación a partir de diversas herramientas bioinformáticas que permiten la interpretación y análisis de la gran cantidad de datos que se generan a partir de un solo experimento [44-52] (Ver Figura 3).

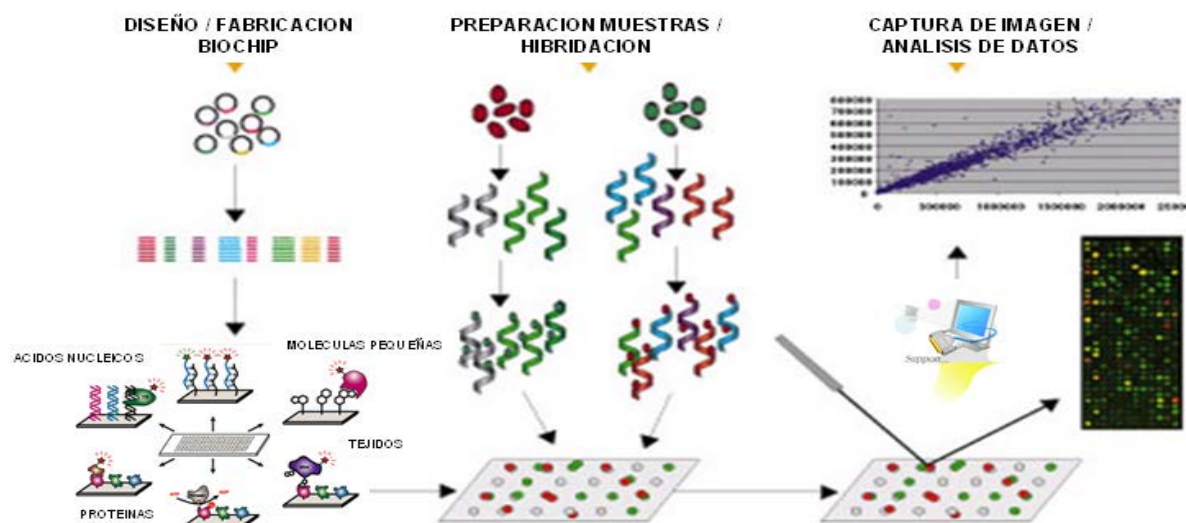


Figura 3. Etapas fundamentales durante el desarrollo de los Biochips de DNA (Tomada y modificada de [www.kbrin.louisville.edu/.../dobbins.html](http://www.kbrin.louisville.edu/.../dobbins.html)).



### 3.7.2 Diseño y fabricación de un Biochip de DNA.

Existen determinados elementos que tienen que ser considerados al momento de fabricar un biochip como: la elección de las sondas, la elección del soporte, la tecnología de inmovilización de las sondas, la técnica de fabricación del array, la estrategia de detección de la hibridación, los sistemas de amplificación de la señal y las herramientas de análisis e interpretación de los datos obtenidos, sobre todo en función de las aplicaciones deseadas [42, 43, 45] (ver Figura 4).



Figura 4. Elementos importantes durante el diseño y la fabricación de los Biochips. (Tomada de Microarrays y Biochips de DNA, 2002).

#### 3.7.2.1 Tipos de sondas.

Entre el tipo de material inmovilizado o “sondas” que son utilizadas en la fabricación de los Biochips de DNA resaltan [42-46]:

**Sondas de oligonucleótidos:** Son las más ampliamente usadas en los Biochips de DNA, pueden sintetizarse *in situ* o bien depositarse sobre el soporte mediante diferentes técnicas de inmovilización. Estas sondas suelen ser lineales y de tamaño limitado (entre 11 y 50 nucleótidos para el análisis de expresión alélica y hasta 100 bases para análisis de expresión génica).

**Sondas de PNAs:** Los ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) son moléculas artificiales con características híbridas de ácidos nucleicos y peptídicos, donde las bases nucleotídicas están unidas a un esqueleto de tipo peptídico en lugar del típico esqueleto de fosforibosas del DNA.

Sondas de cDNA: Estos fragmentos de DNA copia se obtienen por transcripción inversa del mRNA de genes concretos. Los clones de cDNA (mucho más estables que los mRNA) se depositan sobre el arreglo en forma de fragmentos o genes completos, su tamaño puede ser de varios cientos de bases hasta varias Kb.

Productos de PCR: Este tipo de sondas se generan mediante técnicas de PCR donde fragmentos de genes son amplificados de manera exponencial y altamente específica. El tamaño de las sondas obtenidas mediante PCR para fabricar Biochips de DNA suele ser de un tamaño entre 200 y 500 bases.

### **3.7.2.2 Tipos de soportes.**

La deposición de las sondas es un paso fundamental a la hora de diseñar el biochip y esta directamente relacionado con el tipo de soporte y la técnica de fabricación del array. El tipo de soporte en el cual se inmovilizan las sondas suele ser de diferente naturaleza, pero básicamente se pueden dividir en porosos y no porosos. En los chips “**porosos**” las interacciones entre el material a inmovilizar y el soporte sólido de inmovilización por lo general no tienen un carácter covalente. Los soportes más comúnmente empleados son pequeñas porciones de geles, o membranas porosas de nylon o nitrocelulosa presentes sobre portaobjetos de cristal. Los chips lisos o “**no porosos**” son aquellos en los que el material se encuentra por lo general inmovilizado covalentemente a la superficie sólida que le sirve de soporte, la cual puede ser de cristal o cualquier otra superficie como silicio, plástico u oro [42-46].

En la actualidad, debido a su adaptación al marcaje fluorescente, su alta sensibilidad, la posibilidad de realizar distintas reacciones químicas y a su fácil manejo y resistencia, el vidrio ha suplantado a las membranas como soporte para Biochips de DNA. Algunas de las ventajas y desventajas reportadas para los diferentes tipos de soportes se enlistan en la Tabla 3.

Existe un gran número de alternativas a estos soportes todavía en desarrollo, como la inmovilización de DNA sobre geles de acrilamida (<http://www.motorola.com>), sobre matrices de oro (<http://www.interactiva.de>) o sobre soportes totalmente diferentes a las plataformas de membrana o cristal comercializados por Nanogen (<http://www.nanogen.com>) que consisten en conjuntos de microelectrodos cubiertos por una fina capa de agarosa, capaces de generar un campo eléctrico que controla la deposición de las sondas y su hibridación con las secuencias blanco.

Tabla 3. Tipos de soportes para Biochips de DNA: ventajas y desventajas (Tomada de Microarrays y Biochips de DNA, 2002).

Tipo de soporte	Ventajas	Desventajas
Membranas de <b>Nylon</b> y de <b>Nitrocelulosa</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor capacidad de soporte de ADN debido a su superficie porosa.</li> <li>• Reutilizables.</li> <li>• Bajo coste.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor ruido de fondo fluorescente.</li> <li>• Capacidad de miniaturización limitada.</li> <li>• Deformación de la membrana.</li> <li>• Baja resolución.</li> </ul>
Superficies porosas de <b>micropartículas</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mayor flexibilidad</li> </ul>	
Superficies lisas de <b>crystal</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mínimo volumen de hibridación.</li> <li>• Mayor capacidad de miniaturización.</li> <li>• Soporte inerte.</li> <li>• Permite el uso de dos fluorocromos a la vez.</li> <li>• Alta resolución.</li> <li>• Capacidad para aguantar altas temperaturas y lavados de elevada fuerza iónica.</li> <li>• En el caso del cuarzo, hidroxilado de forma natural.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Restricción de la capacidad de carga.</li> <li>• Limitación del número de experimentos por surtido.</li> </ul>
Superficies lisas de <b>plástico</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mínimo volumen de hibridación.</li> <li>• Gran capacidad de soporte de ADN.</li> <li>• Mayor capacidad de miniaturización.</li> <li>• Soporte inerte.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ruidos de fondo por fluorescencia.</li> </ul>

### 3.7.3 Clasificación de los Biochips de DNA.

El auge de este tipo de tecnologías ha facilitado una gran diversificación tecnológica que ha derivado en la necesidad de establecer una nomenclatura y clasificación para estos dispositivos. Los criterios de clasificación son muy variados y abarcan diversos conceptos resumidos en la Tabla 4 (<http://infobiochip.isciii.es>) [42].

Tabla 4. Clasificación de los Biochips de DNA (Tomada de Microarrays y Biochips de DNA, 2002, Adaptada de <http://infobiochip.isciii.es>).

Clasificación de microarrays según:	Características	Nombre
Material inmovilizado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oligonucleótidos.</li> <li>• cDNAs.</li> <li>• Proteínas.</li> <li>• Tejidos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gene Chips.</li> <li>• cDNA Array.</li> <li>• Protein Chip.</li> <li>• Tissue Chip.</li> </ul>
Diseño del array o surtido	Personalizado	Arrayers
	Industrial	Cassettes
Fabricación	Densidad de integración	Alta: microarrays
		Baja: macroarrays
Impresión	Generación de la sonda	"in situ"
		"depositadas"
Soporte / Tipo de unión	No poroso / Covalente	Soporte rígido (Cristal y Plástico)
	Poroso / No covalente	Membranas
Aplicación	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Secuenciación por hibridación.</li> <li>• Detección de cambios en la expresión génica.</li> <li>• Cuantificación de la expresión génica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Chips de secuenciación.</li> <li>• Chips de hibridación comparativa.</li> <li>• Chips de expresión.</li> </ul>

De acuerdo con el tipo de material empleado para su fabricación los biochips se pueden clasificar en [42-46]:

**GeneChips.** Es un nombre comercial de Affymetrix que se aplica a los chips que llevan inmovilizadas sobre su superficie cadenas cortas de oligonucleótidos de entre 20 y 80 nucleótidos. Puede emplearse métodos de síntesis “in situ” o métodos de deposición de los oligonucleótidos.

**Protein Chips.** Chips en los que se inmovilizan diversas proteínas.

**cDNA Arrays.** Chips en los que se inmovilizan cDNA's previamente sintetizados.

**Tissue Chips.** Chips en los que se inmovilizan pequeñas muestras de tejido para facilitar el análisis de varias muestras.

La clasificación en función del diseño permite distinguir dos tipos de biochips: los biochips “**comerciales**” y los biochips “**personalizados**” [42, 43].

Los biochips “**comerciales**” son aquellas soluciones en las que se adquieren los chips con las sondas inmovilizadas y listos para su empleo. El diseño de los elementos de los chips es realizado por la empresa. Para permitir la rentabilidad de su fabricación masiva, las empresas inmovilizan conjuntos de material biológico que no siempre es de utilidad y encarece la posibilidad de personalizar su diseño por parte del comprador. Su principal ventaja es que se adquieren listos para su empleo. Entre estos dispositivos destacan los *Biochips en portaobjetos*, el sistema *Gene-Chip* o *DNA Chip* y uno de los formatos más novedosos los *Chips Microelectrónicos* o *NanoChips*.

Los biochips “**personalizados** o “**home made**” representan una segunda solución fundamentada en el diseño y fabricación por parte de los laboratorios de investigación de sus propios chips mediante unos dispositivos denominados “arrayers”, capaces de depositar cantidades microscópicas de material biológico sobre la superficie del chip.

### 3.7.4 Tecnologías usadas en la fabricación de Biochips de DNA.

Existen diferentes tecnologías para la producción de los Biochips de DNA que han de cumplir una serie de requisitos: robustez, consistencia, automatización, velocidad de fabricación, versatilidad, reproducibilidad, uniformidad, alta precisión, alta resolución y costeabilidad. Las principales estrategias usadas en la fabricación de biochips se muestran en la Tabla 5.

### 3.7.5 Estrategias aplicadas a la detección de la hibridación sobre Biochips de DNA.

Los métodos más utilizados para marcaje de las sondas o del DNA blanco durante el desarrollo de los biochips son los químicos o enzimáticos por su menor peligrosidad y versatilidad, además de facilitar el análisis de varias muestras en el mismo "array" y permitir el escaneado de múltiples marcadores simultáneamente, eliminando la variabilidad cuando se comparan los resultados de dos diferentes "arrays". Los fluoróforos Cy3 y el Cy5 son de los más comúnmente usados con este fin. La Tabla 6 resume algunas características de las técnicas usadas para detectar señales de hibridación sobre la superficie de los biochips de DNA.

Tabla 6. Técnicas de detección de la hibridación sobre los Biochips de DNA (Tomada de Aplicaciones de los Microarrays y Biochips en salud humana, 2005).

Marcaje	Lectura	Características	Ventajas	Desventajas
Enzima (Ej. Fosfatasa alcalina y peroxidasa)	Cromogénica	Se pone en contacto a la muestra marcada con la enzima con un sustrato cromogénico capaz de absorber radiación.		<ul style="list-style-type: none"> <li>Las enzimas pueden confundirse con enzimas nativas presentes en la muestra, aumentando el ruido de fondo.</li> <li>Necesidad del uso de reactivos auxiliares en el proceso de detección.</li> </ul>
Isótopo Radiactivo (Ej. $^{32}P$ o el $^{125}I$ )	Auto-radiografía	Se incorporan a la estructura molecular de la sonda isótopos radiactivos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se necesitan reactivos auxiliares en el proceso de detección.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Radiactividad.</li> <li>Baja resolución.</li> </ul>
Fluorocromo (Ej. Fluoresceína)	Fluorimetría	Un marcador fluorescente emite luz al ser excitado mediante una determinada longitud de onda.	<ul style="list-style-type: none"> <li>No se necesitan reactivos auxiliares en el proceso de detección.</li> <li>Gran sensibilidad, facilidad de uso, reproducibilidad, flexibilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Los escáneres necesarios para la detección encarecen el coste del ensayo.</li> <li>Algunos materiales como el plástico producen fluorescencia.</li> <li>La señal se atenúa con el tiempo.</li> </ul>

Tabla 5. Principales tecnologías empleadas en la fabricación de los Biochips de DNA (Modificada de Aplicaciones de los Microarrays y Biochips en salud humana, 2005, Fuente: Campas M, 2004).

Técnica	Sonda	Densidad	Detección	Ventajas	Desventajas	Aplicación
Ink-jetting en vidrio	Muestras de ADN de 500 nt Fragmentos de PCR	2.780 puntos/ cm <sup>2</sup>	Fluorescencia Radioisotópica	Bajo coste	Baja densidad	Perfiles de expresión, identificación génica, diagnóstico, análisis de polimorfismos
Deposición de pins en membrana	Oligos de 5nt Muestras de ADN de 500-2.000 nt	1.024 puntos en 1,15 cm <sup>2</sup> 64 puntos en 0,6 cm <sup>2</sup>	Fluorescencia Radioisotópica	Bajo coste	Baja densidad	Perfiles de expresión, identificación génica, diagnóstico, análisis de polimorfismos, secuenciación
Fotolitografía con nucleótidos activados	Oligos de 25 nt	9.000 puntos en 1,6 cm <sup>2</sup>	Fluorescencia	Alta densidad	Alto coste Síntesis <i>in situ</i>	Perfiles de expresión, diagnóstico, análisis de polimorfismos
Deposición de pines en electrodos o fotolitografía con oligos activados	Pequeños fragmentos de ADN/ARN	36 dianas en un chip	Impedancia	Bajo coste	Baja densidad Alto coste	Perfiles de expresión, identificación génica, diagnóstico, secuenciación, análisis de polimorfismos
Posicionamiento electrónico	Oligos de 20 nt	99 puntos en 2 mm <sup>2</sup>	Fluorescencia	Alta densidad	Alto coste	Perfiles de expresión, identificación génica, diagnóstico, identificación de STR (short tandem repeat)

### 3.8 Principales aplicaciones de los Biochips de DNA.

Las aplicaciones de los Biochips de DNA en la salud humana son muy diversas, pero básicamente son utilizados en 5 grandes rubros; la identificación de dianas terapéuticas, descubrimiento y desarrollo de fármacos, farmacogenómica y farmacogenética, investigación básica y en el diagnóstico clínico [42-52] (Ver Tabla 7).

Tabla 7. Aplicaciones de los Biochips de DNA en la salud humana (Tomada de Aplicaciones de los Microarrays y Biochips en salud humana, 2005).

Áreas	Aplicaciones	Técnicas
<i>Diagnóstico molecular</i>	Cribado genético	Resequenciación
	Identificación de patógenos	Detección de secuencias de ADN procedentes de patógenos
	Resistencia a fármacos de microorganismos infecciosos	Genotipado de SNPs Análisis de la expresión génica
	Diagnóstico y pronóstico oncológico	Análisis de la expresión génica
<i>Farmacogenética y Farmacogenómica</i>	Identificación de genes	Análisis de la expresión génica Genotipado de SNPs Resequenciación
	Respuesta a fármacos	Genotipado de SNPs
	Diagnóstico predictivo	Genotipado de SNPs
<i>Descubrimiento y desarrollo de fármacos</i>	Cribado de fármacos	Análisis de la expresión génica
	Diseño y estratificación de ensayos clínicos	Genotipado de SNPs

#### 3.8.1 Identificación de dianas terapéuticas.

En la identificación de dianas terapéuticas, la comparación de los niveles de expresión de genes en tejidos sanos y enfermos permite la identificación de genes implicados en enfermedades de interés, así como su asociación con proteínas involucradas en el proceso patológico. Esta información facilita el desarrollo de fármacos que actúen bloqueando o modulando los mecanismos moleculares de la enfermedad [43] (Ver Figura 5).





Figura 5. Principales etapas durante el desarrollo de fármacos (Tomada de Aplicaciones de los Microarrays y Biochips en salud humana, 2005).

### 3.8.2 Descubrimiento y desarrollo de fármacos.

Los Biochips de DNA permiten analizar de forma más rápida los cambios de expresión génica que tienen lugar durante la administración de un fármaco, así como la localización de nuevas dianas terapéuticas y efectos toxicológicos asociados [43] (Ver Figura 6).

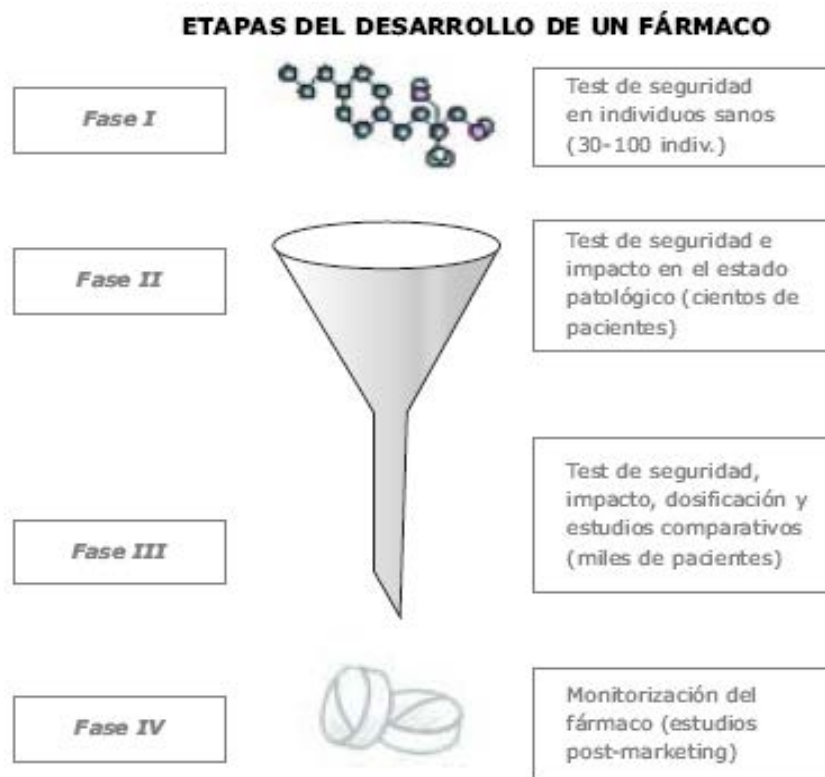


Figura 6. Diferentes fases dentro del proceso de desarrollo de fármacos (Tomada de Aplicaciones de los Microarrays y Biochips en salud humana, 2005).

### 3.8.3 Farmacogenética y farmacogenómica.

La farmacogenética estudia las bases genéticas que influyen en la respuesta individual a los fármacos, mientras que la farmacogenómica hace referencia a las aplicaciones comerciales de la tecnología genómica en el desarrollo de fármacos y terapia, su principal objetivo consiste en definir una enfermedad a nivel molecular de tal manera que las herramientas preventivas y terapéuticas disponibles puedan frenar o mitigar los efectos de la enfermedad. La aplicación clínica de estas herramientas está dirigida al desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas en función del perfil genómico del paciente, siempre en la búsqueda de fármacos y dosificaciones a las cuales el paciente ofrezca una respuesta óptima, o bien, a las que pueda desencadenar reacciones de toxicidad [42-45] (Ver Figura 7).

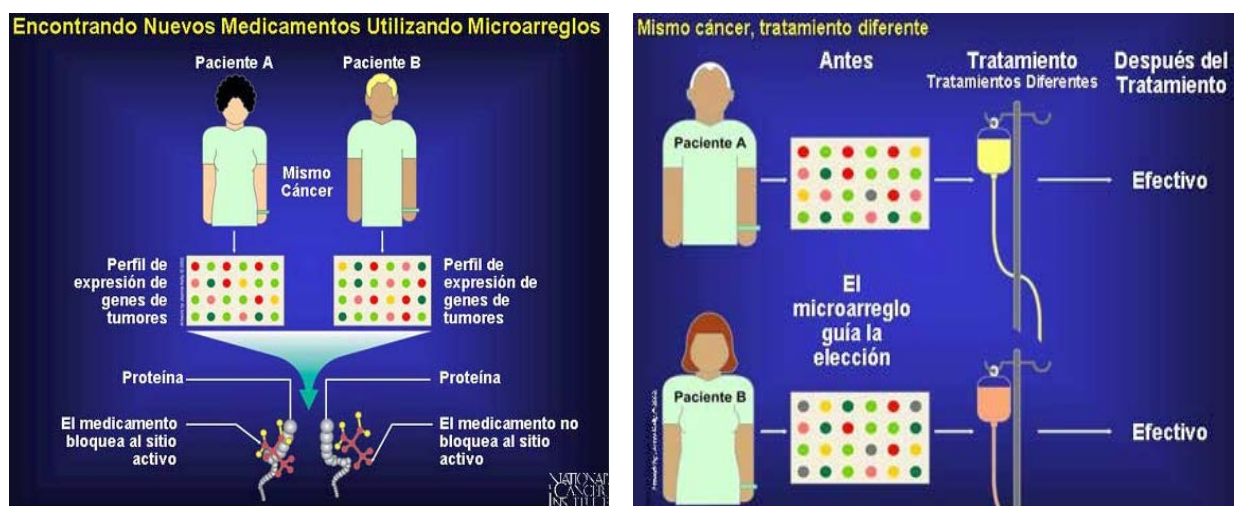


Figura 7. Aplicaciones de la farmacogenética y la farmacogenómica en la salud humana (Tomadas de Entendiendo el diagnóstico molecular <http://www.cancer.gov> ).

### 3.8.4 Investigación básica.

En investigación básica, el estudio de la regulación de genes por medio de los Biochips de DNA proporciona una gran cantidad de datos de gran valor para la identificación de genes involucrados en procesos patológicos y fisiológicos, paso previo al proceso de desarrollo de fármacos. También se facilita la identificación de aquellos genes que están activados diferencialmente cuando se comparan dos condiciones diferentes, ya sea entre células o tejidos normales, en aquellos afectados por algún tipo de patología, en sistemas modelo y en microorganismos patógenos [42-45] (Ver Figura 8).

A)



Identificación de genes implicados en procesos biológicos de interés

B)

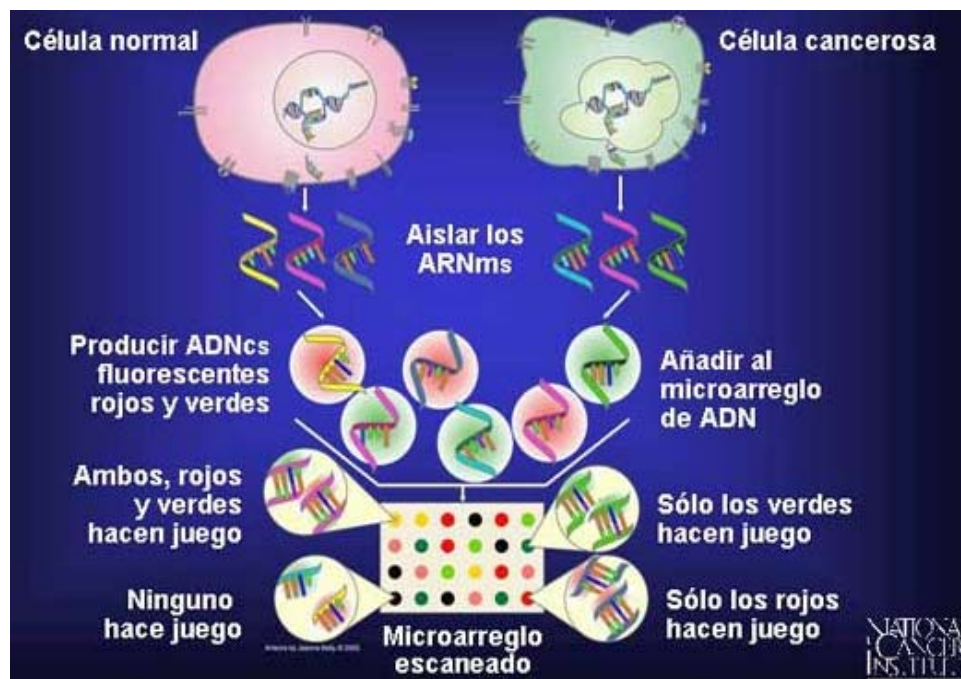


Figura 8. Aplicación de los Biochips de DNA en la investigación básica. Mediante biochips es posible comparar la expresión relativa de miles de genes tanto en procesos celulares normales (A) como alterados (B) solo con medir la intensidad y el color de la fluorescencia de cada sitio (Tomadas de Entendiendo el diagnóstico molecular <http://www.cancer.gov> ).

### 3.8.5 Diagnóstico clínico.

En el diagnóstico clínico, la principal aplicación de los Biochips de DNA es el diagnóstico molecular de enfermedades, donde resultan especialmente útiles para la clasificación de tumores en base a sus perfiles de expresión o patrones moleculares, con la consecuente identificación de marcadores que permiten un diagnóstico más preciso y estudios de análisis de predisposición genética a ciertas enfermedades. También están siendo aplicados a la detección simultánea de un amplio número de microorganismos como bacterias, virus, parásitos y hongos, enfocados a entender su biología, sus mecanismos de resistencia frente a antibióticos, a la identificación de cepas o serotipos y a la caracterización de nuevas dianas génicas con valor terapéutico. Finalmente resultan de gran utilidad durante la caracterización, cuantificación y comparación de DNA (genotipificación), en la secuenciación por hibridación, en la identificación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) y en el diagnóstico molecular de enfermedades infecciosas como el SIDA, la hepatitis o el CC y sus lesiones precursoras (actualmente en fase de desarrollo) (Ver Figura 9 y 10) [42, 43, 46].

- **Estudio epidemiológico molecular de microorganismos:** identificación de los genes responsables de una menor patogenicidad en determinadas cepas de microorganismos. Ejemplo: Microarray de ADN con genes de 19 cepas diferentes de *M. tuberculosis*.
- **Diagnóstico microbiológico:** la mayoría de los arrays empleados hasta la fecha en diagnóstico clínico consisten en arrays de baja densidad. Ejemplos: estos arrays se centran fundamentalmente en la detección de varias especies de un mismo género de bacterias (*Staphylococcus* sp. *Pseudomonas* sp.), presencia de parásitos infecciosos (*Cryptosporidium* sp.), o en el ámbito de la virología clínica, básicamente en su utilización en el genotipado del virus VIH.
- **Estudio de los mecanismos de acción y de resistencia a los agentes antimicrobianos:** los microarrays de ADN se han empleado para el estudio del mecanismo de acción de ciertos compuestos frente a determinados microorganismos, así como en el análisis de la resistencia a antibióticos mediante detección de genes específicos o mutaciones. Ejemplo: Microarrays de ADN para la detección de resistencia a rifampicina en *M. tuberculosis*.

Figura 9. Principales aplicaciones de los Biochips de DNA en la Microbiología clínica (Tomada de Aplicaciones de los Microarrays y Biochips en salud humana, 2005).

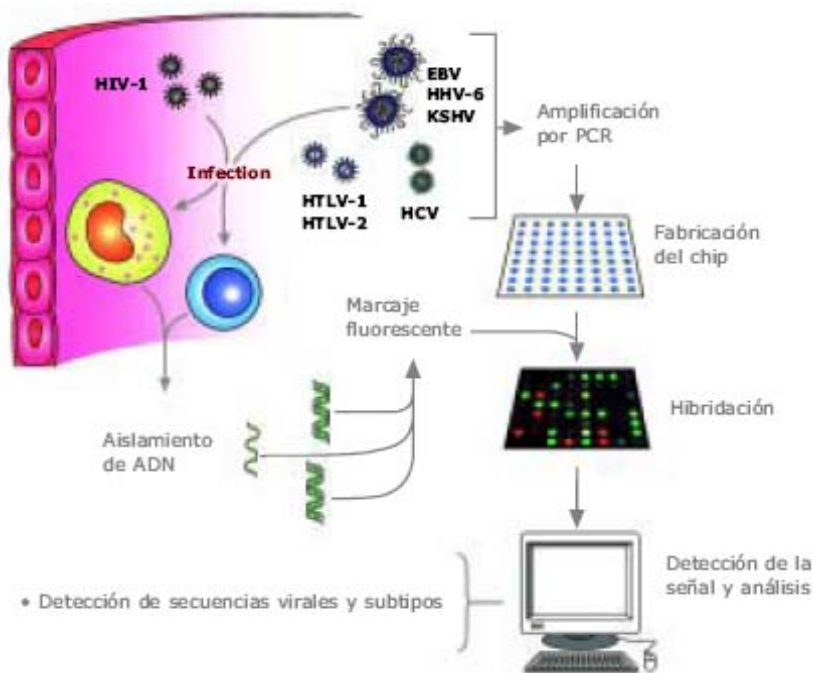


Figura 10. Aplicación de los Biochips de DNA en el diagnóstico molecular del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) asociado a enfermedades infecciosas como el Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (Tomada de Aplicaciones de los Microarrays y Biochips en salud humana, 2005 Fuente: Shieh B, 2004).

### 3.8.5.1 Diagnóstico molecular del VPH mediante Biochips de DNA.

La emergencia global de enfermedades infecciosas ha impulsado el desarrollo de herramientas que faciliten la identificación de un gran número de microorganismos patógenos con relevancia clínica. Dentro de este grupo el VPH ha tenido un gran impacto en el ámbito de salud pública e investigación al ser considerado el factor etiológico de mayor riesgo durante el desarrollo del CC. Estudios clínicos, epidemiológicos y moleculares han detectado DNA de VPH tanto en tejido cervical normal como en CC, demostrándose en la mayoría de los casos que un diagnóstico preciso de VPH puede ser de gran utilidad en la detección de lesiones malignas y premalignas del cervix (CC, HGSIL, LGSIL, ASCUS) con un enorme potencial dentro de programas de prevención y manejo adecuado de pacientes [7-11, 54-56].

Se han descrito un gran número de estrategias clínicas y moleculares para la detección de alteraciones cervicales asociadas a infecciones virales, sin embargo en la mayoría de los casos la plena identificación de infecciones por VPH depende del método de detección usado ya que algunos, como los de hibridación directa, han reportado bajos niveles de detección viral y otros, como los de amplificación, disminuyen su especificidad al hacer uso de iniciadores universales con distintas

afinidades por diferentes tipos de VPH lo que puede llevar a la obtención de datos incompletos o no precisos en estudios clínicos y epidemiológicos [55-57]. Con el surgimiento de tecnologías de alto rendimiento como los Biochips de DNA se pretende mejorar la calidad en el diagnóstico clínico tanto de infecciones por VPH, como de un gran número de patógenos de importancia médica.

Aunque los Biochips de DNA fueron introducidos a finales de la década de los 80's por un grupo de científicos como Stephen Fodor, Michael Pirrung, Leighton Read y Lubert Stryer, los primeros trabajos que evaluaron el potencial de los Biochips de DNA en la detección y tipificación del VPH en CC y lesiones precursoras surgieron casi una década más tarde. El primer Biochip de DNA dirigido a la detección y tipificación del VPH fue el *HPV Oligonucleotide Microarray*, *HPV DNA Chip* o *HPV DNA Microarray* desarrollado por la compañía coreana Biomedlab (Seul, Korea). Este sistema se compone de sondas de oligonucleótidos inmovilizadas sobre soportes de vidrio que reconocen a 22 tipos de VPH, 15 de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 69) y 7 de bajo riesgo (6, 11, 34, 40, 42, 43, 44), además de un grupo control (la  $\beta$ -globina). En este tipo de tecnología el DNA de la muestra es sometido a una PCR estándar en presencia nucleótidos marcados con Cy3 o Cy5 y los iniciadores PC03/PC04 y GP5+/GP6+ que facilitan la amplificación de fragmentos específicos de la  $\beta$ -globina y del gen L1 de un amplio número de VPH. Ambos productos de amplificación son sometidos a hibridación sobre el *HPV DNA Microarray* durante un periodo de 2 horas a 40 °C, cada biochip es posteriormente lavado con 3X SSCP por 2 minutos y 1X SSCP por 2 minutos y secado a temperatura ambiente. Las señales de hibridación pueden ser visualizadas con ayuda de scanners de fluorescencia como el DNA Chip scanner (GSI Lumonics, Ottawa, Canadá). En este tipo de sistemas además de tipificar con una alta precisión un grupo de VPH es posible discriminar ciertos tipos de VPH, detectar infecciones con más de un tipo viral y determinar la carga viral mediante una serie de análisis cuantitativos. En el caso de infecciones con más de un tipo viral, se pueden observar múltiples señales de hibridación. Aunque la fabricación y procesamiento del dispositivo requiere equipo sofisticado se prevé que tiene un gran potencial a futuro. Actualmente la utilidad y practicidad del método continua siendo demostrada, ya que datos preliminares demuestran alta sensibilidad y un amplio rango de detección para muestras con más de un tipo viral. [37].

Aunque son pocos los estudios donde se ha valorado la eficiencia de los *HPV DNA microarray* en la detección de VPH, los resultado obtenidos han podido ser comparados frente al ya bien establecido método de detección viral, la HC2. De esta manera las primeras investigaciones reportan una sensibilidad del 94.9 %, comparable con el 93.7 % que ofreció la HC2 y significativamente mayor a la reportada por la citología convencional (77.1 – 83.6 %), además se reporta una mayor prevalencia de infecciones por HPV en LGSIL (73 - 92 %), HGSIL (83 - 98 %) y CC (91 - 96 %) comparada con los grupos control (17.6 - 32.4 %), donde el mayor factor de riesgo para CC esta dado por infecciones con los tipos 16 (32 - 54 %), 58 (6.5 - 17.5 %) y 18 (7 - 12.5%) frecuentemente identificados.

Adicionalmente, este tipo de dispositivos facilitó la detección de infecciones múltiples, siendo menos frecuentes en CC (2.2 – 13.7 %) que en el grupo control (7.9 - 24.2 %), LGSIL (16 %) y HGSIL (18 %), pero muy frecuentes en mujeres jóvenes (<40 años de edad), permitió la detección de DNA de VPH de alto riesgo hasta en el 84.8 % de pacientes con ASCUS con una sensibilidad entre el 80 y el 100 %. En algunos casos los datos derivados de los *HPV DNA Microarray* han servido de base para calcular el riesgo relativo de desarrollar algún tipo de lesión cervical con ayuda de análisis de regresión logística múltiple donde casos positivos para VPH 16 podrían tener de 3.6 a 5.8 veces mayor riesgo de desarrollar LGSIL y HGSIL que aquellos casos infectados con otros tipos virales, mientras que los tipos 18 y 58 podrían representar un riesgo de 16.2 y 15.4, respectivamente pero asociado al desarrollo de CC [58-67]. En cuanto a la estimación del riesgo relativo de progresión a CC en casos con infecciones simples e infecciones múltiples se reportó que mujeres infectadas con varios tipos de VPH tienen 31.8 veces mayor riesgo de desarrollar CC que aquellas con infecciones simples cuyo riesgo es solo 19.9 veces mayor, estos datos también revelan que el riesgo de desarrollar CC es mayor para aquellas mujeres con historias de familiares con CC (2.3 veces) y en fumadores (3.2 veces) [33, 56, 57].

El *HPV DNA Microarray* es el único biochip comercialmente viable para detección y tipificación simultánea de VPH y aunque generalmente no se proporciona información desfavorable sobre la eficiencia de este tipo de sistemas, si esta documentada una baja sensibilidad en la detección directa de secuencias (a no ser que incorpore amplificación génica) y una gran variabilidad en los ensayos [42, 46]. También se han detectado inconvenientes durante el análisis de los datos y su interpretación, los gastos derivados de la adquisición directa de un arrayer y todos los gastos adicionales asociados a las infraestructuras y materiales, además de que su diseño y manejo puede resultar laborioso y consumir gran cantidad de tiempo y recursos (económicos y humanos) [46].

La versatilidad que ofrece este tipo de sistemas esta generando que muchos laboratorios de investigación exploren la posibilidad de aplicar esta tecnología al diagnóstico molecular a través de la generación de sus propios arreglos. Actualmente existen diversos estudios pilotos enfocados a la generación de sondas para Biochips de DNA dirigidos a la detección de tipos y subtipos de VPH tomando como modelos principalmente a los virus 6, 11, 16 y 18 [62]. Resultados preliminares de estas investigaciones sugieren una alta especificidad y reproducibilidad, aunque para garantizar su eficiencia es necesario mantener condiciones particulares de hibridación y lavado si no se desean alteraciones en el biochip o variaciones en las señales de hibridación.

Ya existen reportes de Biochips de DNA capaces de discriminar al menos 15 tipos de alto riesgo y 12 tipos de bajo riesgo cuya funcionalidad fue validada en tres líneas celulares positivas para VPH (HeLa, CaSki, SiHa), en dos líneas negativas a VPH (C-33A y A549) y muestras clínicas resultando ser una herramienta muy específica y reproducible [66]. En este caso con el conocimiento previo del número

de copias virales en las líneas celulares, fue posible calcular la carga viral relativa de acuerdo con diferencias registradas en la intensidad de la señal.

Otra alternativa es el *high-density DNA Microarray* el cual contempla una gran cantidad de sondas tipo-específicas sobre su superficie que permiten la detección viral mediante técnicas inmunohistoquímicas. Con este dispositivo fue posible detectar hasta 53 tipos diferentes de VPH, 45 tipos mediante el uso de una simple sonda y 8 tipos a partir de una combinación de ellas, aunque en algunos casos no fue posible la discriminación de tipos virales filogenéticamente relacionados [67].

El más reciente Biochip de DNA dirigido a la detección de VPH reconoce 14 VPH de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) mediante el uso de 24 sondas que reconocen un fragmento del gen L1 ubicada dentro de la región de los MY09/11 [68]. Este dispositivo fue probado en un amplio rango de anormalidades citológicas como HGSIL, LGSIL y ASCUS mostrando una alta sensibilidad y especificidad. El uso de iniciadores marcados con Cy3 en lugar de los comúnmente utilizados dNTP-Cy3 simplificó enormemente los protocolos de marcaje. En manos de los autores el Biochip de DNA parece ser una técnica reproducible y rentable, sin embargo todavía es necesario validar su funcionalidad.

Otra interesante opción es la detección bioelectrónica del VPH mediante el sistema eSensor<sup>TM</sup> que se perfila como una plataforma eficiente en la detección de múltiples patógenos [69]. El principio básico de la detección bioelectrónica involucra la formación de un circuito electrónico capaz de identificar hibridación de ácidos nucleicos. Este sistema fue concebido como un biochip de baja densidad, el cual contiene 36 electrodos de oro cargados con sondas de captura de DNA que reconocen secuencias específicas del gen L1 en diversos tipos de VPH. El DNA del VPH en las muestras es reconocido por las sondas de captura sobre la superficie del eSensor<sup>TM</sup> y por otras sondas específicas marcadas con moléculas de ferroceno quienes al formar híbridos generan una corriente eléctrica que puede ser identificada con un medidor de voltaje. Este sistema ha mostrado una sensibilidad del 86% en la detección viral la cual es comparable a la que brindan la HC2 y los Biochips de DNA, con el inconveniente de ser muy costosa.

El potencial de los Biochips de DNA también ha sido aplicado a la detección molecular de variantes específicas del VPH tipo 16, a la detección de genes diferencialmente expresados en CC y en la determinación de genes celulares que son regulados por oncoproteínas codificadas por estos virus [70-74].

Aunque el *HPV DNA Microarrays* ha sido de los sistemas más eficientes que han sido desarrollados hasta hoy, su casi nula aplicación en los sistemas de salud actuales, en parte debido al elevado costo que representan, sugiere que es necesaria la implementación de nuevas alternativas que en términos de sensibilidad, especificidad, practicidad y economía aseguren su aplicación clínica y un diagnóstico preciso. En consecuencia, es necesario concentrar grandes esfuerzos al desarrollo y validación de nuevas estrategias que cubran estas necesidades.



En México desde hace 20 años, la mortalidad por CC se mantiene constante a pesar de la existencia de programas poblacionales de detección oportuna. Entre los factores identificados como responsables del escaso efecto de estos programas de prevención resalta su baja cobertura a nivel poblacional (que es alrededor del 15%), su baja eficiencia, ya que se estima que el programa sólo previene el 13% de los casos potencialmente prevenibles y la deficiente calidad de las muestras clínicas procesadas (<http://www.insp.mx>). De aquí la importancia de generar herramientas diagnósticas que nos permitan mejorar la calidad de los programas de diagnóstico oportuno de CC, una de las neoplasias con un alto potencial de prevención secundaria.

Sería sumamente útil poder realizar un tamizaje adecuado y diagnosticar a las mujeres infectadas por tipos de VPH de alto riesgo, ya que ello facilitaría una vigilancia más estrecha de aquellas persistentemente infectadas y con mayor riesgo de progresión hacia CC. Es por este aspecto tan importante que el objetivo de este trabajo fue aplicar la tecnología de los Biochips de DNA a la detección y tipificación molecular de VPH considerados de alto riesgo en el desarrollo de CC aplicando herramientas novedosas para el diseño y detección específica de secuencias que de manera confiable faciliten la identificación de infecciones por VPH de alto riesgo en CC, además de proporcionar alternativas novedosas al diagnóstico molecular de enfermedades cuya aplicación resulta factible tanto en el campo de la investigación básica como en los servicios de salud.

## **4.0 JUSTIFICACION**

La aplicación de las técnicas de biología molecular a la detección de VPH han reafirmado el papel tan importante que estos desempeñan en el desarrollo del CC y aun cuando la identificación de los tipos, subtipos y variantes es complicada y a menudo compleja, es importante continuar con este tipo de estudios para tener en el futuro un protocolo de manejo adecuado que permita un diagnóstico oportuno y con ello una reducción en la incidencia y mortalidad del CC.

En estudios epidemiológicos mundiales se ha estimado que entre el 2 y el 20% de la población femenina es portadora oculta del VPH en el cuello uterino. Algunas de estas infecciones pueden convertirse en persistentes con capacidad de inducir e incrementar el riesgo de progresión a CC. En México esto resulta especialmente relevante ya que el CC es una patología con una alta incidencia y una de las principales causas de muerte por tumores malignos en las mujeres.

Los tipos de VPH identificados con mayor frecuencia en CC, según investigaciones epidemiológicas a gran escala, son en orden descendente los tipos 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59, 56, 39, 51, 73, 68 y 66 y de acuerdo con las estadísticas al menos el 88 % de los casos con CC en todo el mundo (con más de 10 000 muestras analizadas) puede ser atribuible a la presencia de al menos 8 de estos tipos: 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35, considerados de alto riesgo en la progresión neoplásica. El papel que juegan estos tipos de VPH en el desarrollo de CC y lesiones precursoras es aún incierto pues la caracterización de las secuencias y su identificación es aun limitada. Sin embargo, se ha documentado que variaciones en el genoma de los VPH pueden ser determinantes de su conducta biológica, por lo que son necesarios diversos esfuerzos en investigación para identificar los cambios que nos permitan estimar el riesgo individual de padecer la enfermedad de acuerdo con el tipo viral.

Un gran número de técnicas han sido utilizadas para la identificación de infecciones por VPH y aunque todas han contribuido en mayor o menor medida al conocimiento de la naturaleza de la carcinogénesis cervical, aun no existe una técnica diagnóstica completamente satisfactoria en términos de sensibilidad, especificidad, practicidad y economía.

El enorme potencial que ofrece la detección oportuna de infecciones por VPH de alto riesgo en los programas de prevención y control del CC, promueve activamente el desarrollo de novedosas alternativas que optimicen su detección. El auge de las herramientas moleculares durante las últimas décadas ha favorecido el desarrollo de tecnología de alto rendimiento como los Biochips de DNA uno de los sistemas de detección y tipificación de VPH más eficientes hasta hoy desarrollados. Esta tecnología además de facilitar la identificación de infecciones por tipos de VPH específicos, permite la detección de infecciones con más de un tipo viral (infecciones múltiples), hecho que ninguna otra técnica permite identificar de manera directa en un simple ensayo.

La disponibilidad actual de los Biochips de DNA enfocados a la detección y tipificación de infecciones por VPH aún es escasa y su eficiencia continúa siendo evaluada. Existen reportes que indican la necesidad de optimizar los procesos de diseño y estandarización, dos aspectos fundamentales que pueden ser el reflejo de señales inespecíficas y la baja reproducibilidad reportada en los ensayos. Esto aunado a los elevados costos que representa su fabricación y procesamiento, hacen que los Biochips de DNA disponibles a nivel comercial representen una herramienta demasiado cara para establecerse como técnica de rutina, lo que explica su baja aplicabilidad en investigación y en los sistemas de salud. De aquí la necesidad de proponer alternativas a los procesos de diseño, fabricación y procesamiento en este tipo de sistemas que garanticen tanto su aplicación clínica como un diagnóstico viral preciso.

En este contexto, este trabajo propone la aplicación de los Biochips de DNA a la detección y tipificación de VPH de alto riesgo en el desarrollo de CC proponiendo novedosas alternativas a las etapas de diseño, fabricación y procesamiento que permitan incrementar su eficiencia y su viabilidad en los servicios de salud. Entre los beneficios que esto trae consigo resalta la implementación de técnicas enfocadas al pronóstico y diagnóstico de la enfermedad como un primer paso en el desarrollo de medidas preventivas, donde la plena identificación y oportuna intervención de pacientes con infecciones por VPH de alto riesgo podría tener un impacto significativo en la reducción de la incidencia y mortalidad por CC, evitando tratamientos e intervenciones innecesarias y mejorando la calidad de los servicios de salud.

## **5.0 HIPÓTESIS**

Con el desarrollo y aplicación de un Biochip de DNA que incluye el uso de pequeños oligonucleótidos y novedosas alternativas a los procesos de diseño y fabricación se podrá detectar y tipificar virus de papiloma humano de alto riesgo con un alto nivel de sensibilidad y especificidad en muestras de epitelio cervical.

## **6.0 OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un Biochip de DNA con oligonucleótidos que identifiquen fragmentos específicos del gen L1 de los virus de papiloma humano de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 y evaluar su funcionalidad en la detección y tipificación viral en muestras de cáncer cervical.

## **6.1 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1.- Diseñar un Biochip de DNA para la detección y tipificación de los virus de papiloma humano 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 con la ayuda de diversas herramientas bioinformáticas y el uso de oligonucleótidos dirigidos al reconocimiento específico de fragmentos de su gen L1.
- 2.- Realizar la estandarización del Biochip de DNA para la identificación de VPH de alto riesgo a partir de una serie de oligonucleótidos con funciones específicas (sondas, DNA blanco o secuencia viral de referencia, oligonucleótidos estabilizadores, secuencias reporteras Cy3).
- 3.- Amplificar fragmentos específicos del gen L1 de virus de papiloma humano de alto riesgo en muestras de cáncer cervical a partir del uso de iniciadores específicos.
- 4.- Validar la funcionalidad del Biochip de DNA en la detección y tipificación de virus de papiloma humano de alto riesgo en amplificadores virales previos provenientes de muestras de cáncer cervical.

---

## 7.0 MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio es de tipo experimental. La estrategia para la detección de las variantes AA y E del VPH 16 a partir del gen E6 se describen en el **Anexo 1**. La estrategia para la detección de los VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 a partir del gen L1 se describe a continuación.

### 7.1 Líneas celulares y muestras clínicas.

Se trabajo con DNA de tres líneas celulares CaSki, SiHa y C-33A, con DNA de VPH 18 clonado en un plásmido bacteriano y con DNA proveniente de muestras clínicas con CC. CaSki con 60 a 600 copias de VPH 16, SiHa con 1 -10 copias de VPH 16 y el DNA del VPH 18 fueron usados como controles positivos para VPH, mientras que C-33A negativa para VPH fue usada como control negativo. El DNA viral de las líneas celulares y de las muestras clínicas fue extraído mediante técnicas convencionales de extracción y purificación de ácidos nucleicos.

### 7.2 Amplificación de fragmentos del gen L1 de VPH de alto riesgo.

Para validar la funcionalidad del Biochip de DNA en la detección y tipificación molecular de VPH, se amplificó una región del gen L1 de los tipos de VPH 16, 18 y 58 considerados de alto riesgo en CC ubicada dentro de la región de los MY09/11, también se amplificó un fragmento del gen de la  $\beta$ -Globina el cual fue usado como control interno. El tamaño del amplificado de estos VPH corresponde a un producto de PCR de entre 181 y 188 pb, mientras que el de la  $\beta$  – Globina fue de 110 pb. Tres pares de iniciadores tipo-específicos de entre 20 y 24 ntd fueron utilizados para amplificar a los VPH 16, 18 y 58; los L1-16f (ntds 6584-6603) y L1-16r (ntd 6767-6744), los L1-18f (ntds 6557 - 6577) y L1-18r (ntd 6744 - 6721) y los L1-58f (ntds 6585 - 6605) y L1-58r (ntd 6768 - 6745), en el caso de la  $\beta$ -globina se usaron los ya reportados PCO3 y PCO4 [60, 61, 63, 65] (Ver Tabla 8).

Durante los procesos de PCR convencional y con la finalidad de establecer las condiciones óptimas del producto de amplificación deseado, dos condiciones experimentales distintas denominadas PCR-1 y PCR-2 fueron inicialmente evaluadas. Tanto la PCR-1, como la PCR-2 contenían los tres pares de iniciadores tipo-específicos previamente propuestos (L1-16f/r, L1-18f/r, L1-58f/r) en la misma mezcla de reacción, pero cada una fue evaluada bajo diferentes condiciones de temperatura (Ver Tabla 8). La mezcla de reacción contenía: 50 pmol de cada uno de los iniciadores, al menos 100 ng de DNA molde, 50 pmol de cada uno de los iniciadores, 1.25 U Taq polimerasa (Fermentas Inc), 10 mM de dNTPs, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> y 5  $\mu$ L de 10X Taq Buffer with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> [750mM Tris-HCl pH 8.8, 200mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0.1% (v/v) Tween 20], todo en un volumen final de 50  $\mu$ L. Las temperaturas programadas para la PCR-1 fueron: 94° C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94° C por 30 segundos, 48° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto

con una extensión final a 72° C por 5 minutos, mientras que para la PCR-2 fueron: 94° C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos a 94° C por 30 segundos, 55° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto con una extensión final a 72° C por 5 minutos. Todos los amplificadores obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio.

### 7.2.1 Síntesis cíclica de amplificadores provenientes de VPH de alto riesgo mediante PCR.

Cada uno de los productos de amplificación previamente obtenidos por PCR convencional fue sometido al proceso de síntesis cíclica usando solamente uno de los iniciadores. Este proceso genera un amplio número de copias de cadena sencilla de la cadena sentido del amplificado viral, previo a su hibridación sobre los Biochips de DNA. Al producto de esta síntesis cíclica se le denominó PCR-1cs y fue obtenido bajo las mismas condiciones experimentales que la PCR-1 pero usando como DNA molde 4 µL del producto final de reacción de la PCR convencional como DNA molde y solo los iniciadores L1-16f, L1-18f y L1-58f (Ver Tabla 8).

Tabla 8. Iniciadores usados en la amplificación por PCR de fragmentos específicos del gen L1 de VPH de alto riesgo.

Gen	Nombre	Longitud	Iniciador	Ubicación	Secuencia
VPH	Amplificado	(pb)	PCR	(5' → 3')	(5' → 3')
L1	PCR-1 / PCR-2	184 -188	L1-16f	6584 - 6603	GCACAGGGCCACAATAATGG
			L1-16r	6767 - 6744	GAAAAATAAACTGTAAATCATATT
			L1-18f	6557 - 6577	GGCACAGGGTCATAACAATGG
			L1-18r	6744 - 6721	GAAAAATAAACTGCAAATCATATT
			L1-58f	6585 - 6605	CGTGACACAAGGTCATAACAAT
			L1-58r	6768 - 6745	GAAAAACAACTGTAAAGTCATATT
	PCR-1cs	184 -188	L1-16f	6584 - 6603	GCACAGGGCCACAATAATGG
			L1-18f	6557 - 6577	GGCACAGGGTCATAACAATGG
	β-Globina	110	PCO3**	14 - 33	ACACAACCTGTGTTCACTAGC
			PCO4**	123 - 104	CAACTTCATCCACGTTCC

\*\* = Marcaje 5' Cy3, secuencia según referencias 60, 61, 64, 65.

### 7.3 Características generales del Biochip de DNA para la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC.

El desarrollo del Biochip de DNA incluyó el uso de una serie de pequeños oligonucleótidos de DNA con funciones específicas durante el proceso como: sondas, DNA blanco, oligonucleótidos estabilizadores, secuencias reporteras Cy3 e iniciadores específicos (MWG-BIOTECH Inc., Mendenhall, USA).

#### 7.3.1 Características de las sondas.

Las sondas estuvieron representadas por pequeños oligonucleótidos de DNA de entre 21 y 24 nucleótidos las cuales fueron sintetizadas con una modificación en su extremo 3' donde una molécula de aminopropanol fue químicamente incorporada y cuya función fue permitir la unión de las sondas a la matriz de soporte durante la fabricación del Biochip de DNA (Ver Figura 16). La inmovilización de las sondas fue posible gracias a la formación de un enlace covalente entre los grupos aminos de las sondas y los grupos de silicatos presentes sobre la superficie del soporte [75].

El diseño del Biochip de DNA incluyó un total de 8 sondas denominadas 16-SN, 18-SN, 31-SN, 33-SN, 35-SN, 45-SN, 52-SN y 58-SN las cuales permiten identificar a los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 respectivamente. Dos sondas más denominadas  $\beta$ -Gson y RET fueron usadas como controles positivo y negativo respectivamente; la primera corresponde a un fragmento del gen de la  $\beta$ -Globina, la segunda representa un fragmento del gen RET (Ver Tabla 9).

En una primera etapa, la capacidad de cada una de las sondas por identificar de manera específica a cada uno de los VPH fue evaluada de forma virtual o "*in silico*" con ayuda de diversas herramientas bioinformáticas donde es posible determinar características ideales en las sondas (tamaño, Tm, contenido de GC, etc.) que puedan incrementar su potencial de detección y tipificación viral al ser aplicadas en sistemas reales como los Biochips de DNA.

Una vez que se validó virtualmente la funcionalidad de las sondas en la detección y tipificación viral, un grupo de 3 sondas que identifican a los VPH 16, 18 y 58 fueron seleccionadas para evaluar su potencial real sobre los Biochips de DNA. La validación del Biochip de DNA a partir de estos tipos virales responde básicamente a nuestra disponibilidad tanto de líneas celulares positivas para VPH, como a su elevada frecuencia en muestras clínicas con CC y lesiones precursoras.



Tabla 9. Sondas propuestas para la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC mediante Biochips de DNA.

Nombre	Tipo VPH	Tamaño (ntd)	Contenido G/C (%)	Tm (°C)	Secuencia (5' → 3')
16 – SN **	16	21	38.1	54.0	GTTTCTGAAGTAGATATGGCA
18 – SN **	18	24	52.4	57.4	CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA
31 – SN	31	22	40.9	52.9	GTATCACTGTTTGCAATTGCAG
33 – SN	33	24	41.7	52.7	CTGTCACTAGTAGTTACTTGTGTG
35 – SN	35	20	50.0	52.6	CTGTCACTAGAAGACACAGC
45 – SN	45	19	47.4	52.1	CTTGGCACAGGATTTTGTG
52 – SN	52	22	40.9	52.1	CTTTCCTTTTTTAACCTCAGCAC
58 – SN **	58	21	38.1	54.0	GTACCTTCCTTAGTTACTTCA
β - Gson †	-	45	62.2	72.3	GCCCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTT
RET ‡	-	7	71.4	15.4	CTCCTCAGG GCCATCC

\*\* = Sondas inicialmente usadas en la validación del Biochip de DNA a partir de líneas celulares y muestras clínicas positivas para VPH de alto riesgo en CC.  
† = Control positivo β-Globina, ‡ = Control Negativo gen RET

### 7.3.2 Características del DNA blanco sintético.

Después de validar la eficiencia del Biochip de DNA en ensayos “*in silico*” mediante diversas herramientas bioinformáticas, primero se procedió a valorar su verdadera funcionalidad en base al reconocimiento de oligonucleótidos de entre 184 y 188 pb que simulaban la secuencia de referencia de los VPH 16, 18 y 58. Un total de tres oligonucleótidos denominados DNABs-L1/16, DNABs-L1/18 y DNABs-L1/58 sirvieron a este propósito (Ver Figura 16 y Tabla 10).

### 7.3.3 Características de los oligonucleótidos estabilizadores.

Con la finalidad de asegurar una mayor especificidad en el reconocimiento de secuencias entre el DNA blanco y las sondas e incrementar el potencial de detección viral durante los procesos de hibridación, adicionalmente usamos tres oligonucleótidos tipo-específicos de 62 bases denominados oligonucleótidos estabilizadores ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58. Cada uno de los oligonucleótidos estabilizadores se compone de dos regiones; la primera región de entre 41 y 44 bases es 100 % complementaria a la región contigua al sitio de reconocimiento de la sonda tanto en los oligonucleótidos usados como DNA blanco o secuencias de referencia DNABs-L1/16, DNABs-L1/18 DNABs-L1/58 como en los productos de amplificación PCR-1 obtenidos de las líneas celulares y de las muestras clínicas, la segunda región representa una secuencia de DNA de 18 bases que solo es reconocida por pequeños oligonucleótidos previamente marcados con Cy3 (REP/UNI-Cy3) (Ver Figura 16 y Tabla 11).

#### 7.4 Matriz de soporte para la fabricación de los Biochip de DNA.

Para implementar los Biochips de DNA se usaron como matriz de soporte laminillas para microscopio VWR microslides (selected, precleaned Superfrost Plus) comercializados por VWR Scientific, West Chester, Pa. Sobre estas laminillas fueron depositadas las sondas de DNA que contenían la secuencia de interés en los VPH de alto riesgo. Los VWR microslides (selected, precleaned Superfrost Plus) facilitan la adhesión de moléculas con carga positiva sobre la superficie de la laminilla, lo que favorece la inmovilización de las sondas y como son resistentes al calor resultan ideales en procesos de hibridación (<http://uk.vwr.com/app/search/Search>) (Ver Figura 16).

#### 7.5 Inmovilización de las sondas sobre los Biochips de DNA.

Para inmovilizar las sondas 16-SN, 18-SN y 58-SN sobre la matriz de soporte, cada una de ellas fue diluida en agua inyectable a una concentración de 20 pmol/ $\mu$ L aplicandose en hileras de cuatro gotitas de 200  $\eta$ L cada una sobre un patrón previamente definido buscando garantizar la reproducibilidad de los resultados (Ver Figura 11). Mediante este procedimiento se obtiene una densidad aproximada de  $10^{10} - 10^{11}$  moléculas/ $\text{mm}^2$  que corresponde a un espacio intermolecular de aproximadamente 30 - 100  $\text{Å}$  [76, 77].

Una vez que las sondas fueron depositadas sobre las laminillas se dejaron secar al aire libre y se almacenaron en un desecador a temperatura ambiente. Previo al proceso de hibridación estas laminillas fueron puestas en contacto con un agente bloqueador (Tripolifosfato 10 mM) durante 1 hora, se dejaron secar al aire libre y nuevamente fueron almacenados. Estos dispositivos representan los Biochips de DNA utilizados durante los procesos de hibridación (Ver Figura 11).

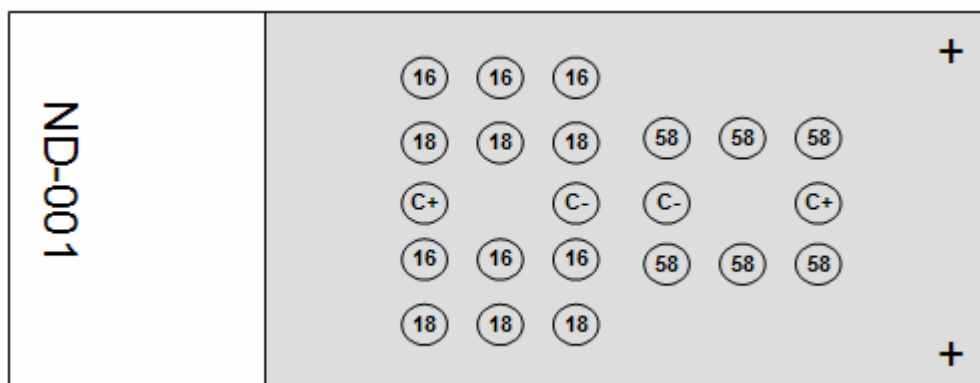


Figura 11. Patrón de inmovilización de las sondas utilizadas en la validación del Biochip de DNA dirigido a la detección molecular de VPH de alto riesgo (16 = 16-SN, 18 = 18-SN, 58 = 58-SN C+ =  $\beta$ -Gson, C- = RET).

Tabla 10. Oligonucleótidos usados como DNA blanco o secuencia de referencia de los VPH 16, 18 y 58 durante el proceso de estandarización del Biochip de DNA.

Nombre	Tipo VPH	Tamaño (ntd)	Contenido G/C (%)	Tm °C	Secuencia de referencia (5' → 3')
DNAbs-L1/16	16	184	35.9	>75	GCACAGGGCCACAATAATGGCATTGTGGGGTAACCAACTATTTGTTACTGTT GTTGATACTACACGCAGTACAAATATGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCA GAAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGGAGTACCTACGACATGGGGAGGAA TATGATTTACAGTTTATTTTTTC
DNAbs-L1/18	18	188	38.3	>75	GGCACAGGGTCATAACAATGGTGTGGCTGGCATAATCAATTATTTGTTACTGT GGTAGATACCACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCC TGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGA GGAATATGATTTGCAGTTTATTTTTTC
DNAbs-L1/58	58	184	35.3	>75	CGTGCACAAGGTCATAACAATGGCATTGTGGGGCAATCAGTTATTTGTTACC GTGGTTGATACCACTCGTAGCACTAATATGACATTATGCACTGAAGTAAC TAAG GAAGGTACATATAAAAATGATAATTTAAGGAATATGTACGTCATGTTGAAGAA TATGACTTACAGTTTGTTTTTTC

DNAbs-L1/16, DNAbs-L1/18, DNAbs-L1/58 = oligonucleótidos cuya secuencia simuló la secuencia de referencia de fragmento específicos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58.

Tabla 11. Oligonucleótidos estabilizadores y secuencias reporteras Cy3 usadas para detectar señales de hibridación viral sobre la superficie de los Biochips de DNA.

Nombre	Tipo VPH	Tamaño (ntd)	Contenido G/C (%)	Tm °C	Secuencia (5' → 3')
ONEST/16	16	62	41.9	>75	<b>GCCTTTACGAGCCAGCAC</b> <u>CCCCATGTCGTAGGTACTCCTTAAAGTTAGTATTTTTATATGTA</u>
ONEST/18	18	62	43.5	>75	<b>GCCTTTACGAGCCAGCAC</b> <u>CAACATGCTCTGCTATACTGCTTAAATTTGGTAGCATCATATTGC</u>
ONEST/58	58	62	33.9	72.7	<b>GCCTTTACGAGCCAGCAC</b> <u>CAACATGACGTACATATTCCTTAAAATTATCATTTTTATAT</u>
REP/UNI-Cy3	---	18	61.1	58.2	✧ GTGCTGGCTCGTAAAGGC

La secuencia subrayada representa la región complementaria al DNA blanco de los VPH 16, 18 y 58, mientras que el fragmento en negritas representa la región que es reconocida de manera específica por la secuencia reportera universal marcada con Cy3 (REP/UNI-Cy3).

✧ = Marcaje Cy3

## 7.6 Detección de la hibridación sobre los Biochips de DNA.

La detección de las señales de hibridación viral sobre los Biochips de DNA fue posible gracias al uso de pequeños oligonucleótidos (18 bases) marcados en el extremo 5' con moléculas fluorescentes Cy3 denominadas REP/UNI-Cy3 y a la aplicación de estrategias de hibridación múltiple. En este sistema de detección, al mismo tiempo que las sondas reconocen e hibridan con su secuencia complementaria en el DNA blanco (DNAbs-L1/16, DNAbs-L1/18, DNAbs-L1/58 o PCR-1), también lo hacen los oligonucleótidos estabilizadores tipo-específico (ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58), que también son reconocidos por los REP/UNI-Cy3 y finalmente son los que permiten detectar la hibridación de las secuencias virales sobre los Biochips de DNA. De esta manera, mientras se cuenta con secuencias auxiliares como los oligonucleótidos estabilizadores que por un lado sean capaces de unirse a un DNA blanco de interés o bien con secuencias reporteras como los RE/UNI-Cy3, podrán ser identificados en procesos de hibridación múltiple sobre Biochips de DNA, evitando marcajes innecesarios en las secuencias analizadas (Ver Figura 16 y Tabla 11).

### 7.6.1 Soluciones de hibridación.

Las reacciones de hibridación sobre los Biochips de DNA fueron evaluadas básicamente en solución citrato salina (SSC 3X / SDS 0.1 %) bajo diferentes condiciones experimentales, sin embargo una solución de hibridación en presencia de cloruro de tetrametil amonio (TMAC) 5M (Sigma Chemical, Co.) fue también evaluada. Ambas condiciones de hibridación se enlistan en las Tablas 12 y 13.

Cuarenta  $\mu$ L de cada solución de hibridación fue adicionada sobre el área de inmovilización de las sondas sobre los Biochips de DNA, posteriormente se colocó un cubreobjeto sobre la superficie evitando la formación de burbujas, cada laminilla fue depositada sobre una superficie plana e incubada 3 horas con agitación constante a 37 °C de temperatura en un ambiente húmedo. Al finalizar la incubación, cada cubreobjetos fue retirado de la superficie del Biochip de DNA mediante su inmersión y ligera agitación en la solución de hibridación correspondiente (en ausencia de secuencias de DNA) por periodos de 5 minutos y dos lavados posteriores de 3 minutos, el primero en SSC 1X y el segundo en SSC 0.1X. Finalmente se dejaron secar a temperatura ambiente y se protegieron de la luz hasta su análisis.

Cada una de las hibridaciones realizadas sobre los Biochips de DNA contenían los tres oligonucleótidos estabilizadores tipo-específico ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58, además del DNA blanco de interés y los REP/UNI-Cy3 incrementando la posibilidad de identificar más de un tipo viral en las muestras analizadas.

Tabla 12. Solución de hibridación en cloruro de tetrametil amonio (TMAC).

Reactivo	Concentración	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
TMAC †	5M	24
SDS †	10 %	0.4
Tris pH 8.0 †	1M	1.8
EDTA †	0.5 M	0.2
PEG †	40 %	3.0
Agua ampolleta †	- - -	3
Estabilizador (ONEST/16, ONEST/18 o ONEST/58)	100 pmol / $\mu\text{L}$	1
REP/UNI-Cy3	100 pmol / $\mu\text{L}$	1
DNAbs-L1/16, DNAbs-L1/18, DNAbs-L1/58 o amplificados PCR-1	5 – 200 pmol / $\mu\text{L}$	25
		60

† = Reactivos contenidos en la solución de lavado de los Biochips de DNA.

Tabla 13. Solución de hibridación en solución citrato salina (SSC).

Reactivo	Concentración	Volumen ( $\mu\text{L}$ )
SSC / SDS †	3X / 0.1 %	10 a 30
Estabilizador (ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58)	100 pmol / $\mu\text{L}$	0.5 a 2
REP/UNI-Cy3	100 pmol / $\mu\text{L}$	1 a 2
DNAbs-L1/16, DNAbs-L1/18, DNAbs-L1/58 o amplificados PCR-1	5 – 200 pmol / $\mu\text{L}$	10 a 40
		60

† = Reactivos contenidos en la solución de lavado de los Biochips de DNA.

### 7.6.2 Captura de imágenes sobre los Biochips de DNA.

La detección de las señales de hibridación sobre los Biochips de DNA fueron visualizadas y captadas con ayuda de un escaner para microarreglos marca Scanarray™ Express (BioChip Technologies, Perkin Elmer) bajo las siguientes condiciones: longitud de onda para Cy3 de 543 nm, resolución de 30 µm, potencia del fotomultiplicador (PMT gain) del 70 % y poder del láser entre 50 y 80 %.

### 7.7 Herramientas bioinformáticas aplicadas al diseño del Biochip de DNA.

La secuencia de referencia del gen L1 para los VPH de alto riesgo fueron obtenidas de la base de datos **Los Alamos Database** (Los Alamos National Laboratory/HPV Sequence Database <http://hpv-web.lanl.gov>). El alineamiento de cada una de estas secuencias virales fue realizado en dos programa de alineamientos de múltiples secuencias **ClustalW** Versión 1.83 (Multiple sequence alignment program <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>, <http://align.genome.jp>) y **T-Coffee** Versión 4.71 (Tree-based Consistency Objective Function For alignment Evaluation) (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>). La evaluación de especificidad para cada una de las secuencias de DNA viral manejadas se realizo con ayuda del **OligoAnalyzer Program** Versión 3.0 (Integrated DNA Technologies <http://www.idtdna.com>) y del **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool) (GenBank Database / NCBI <http://www.ncbi.nih.gov>).

### 7.8 Esquema general de trabajo.

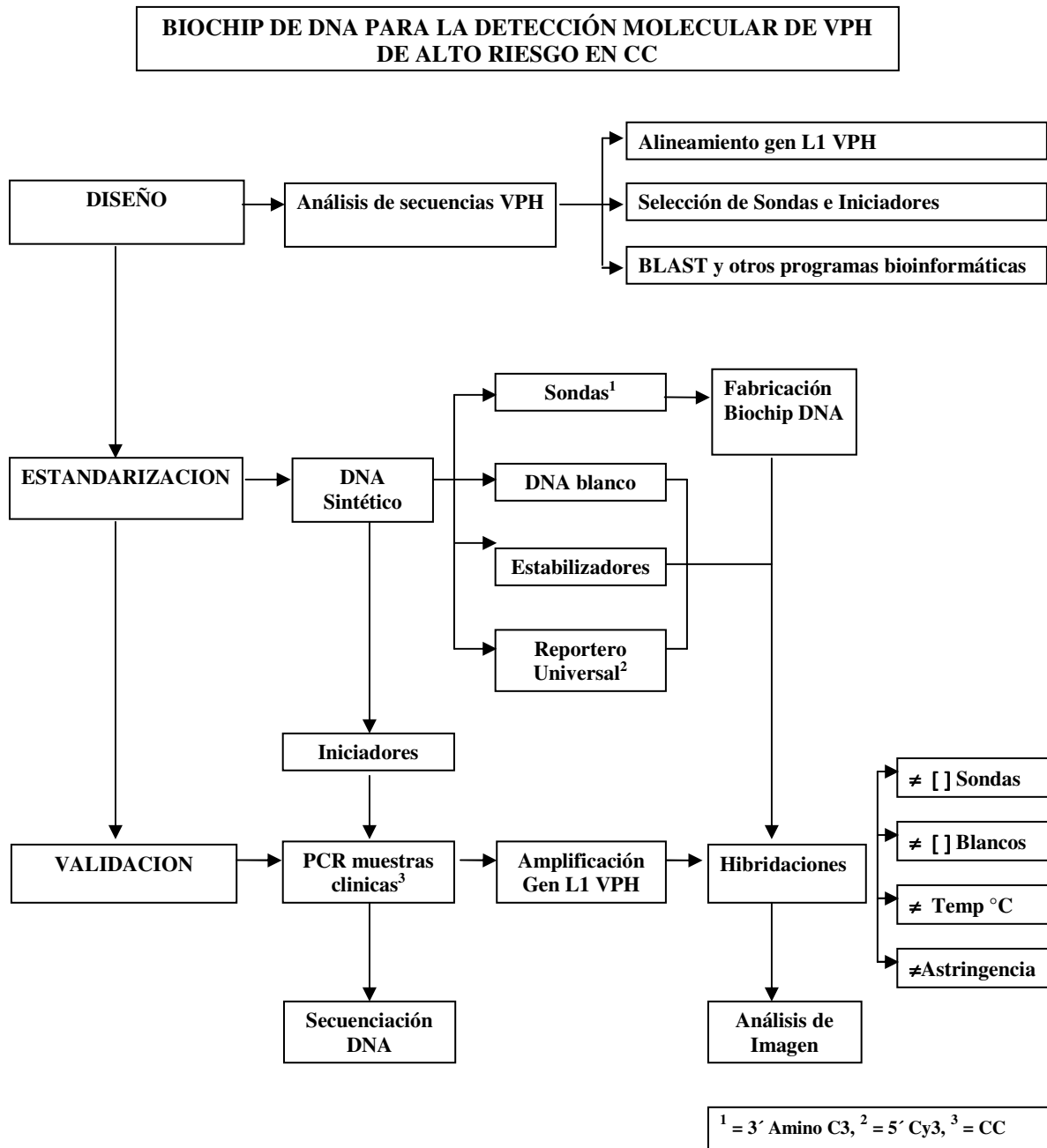


Figura 12. Estrategia general para el desarrollo del Biochip de DNA dirigido a la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC.



## 8.0 RESULTADOS Y DISCUSION

### 8.1 Desarrollo del Biochip de DNA para la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC.

El Biochip de DNA para la detección y tipificación molecular de VPH de alto riesgo en CC fue desarrollado en tres etapas fundamentales: **diseño**, **estandarización** y **validación** (Ver Figura 12). La estrategia para la detección de las variantes AA y E del VPH 16 a partir del gen E6 se describen en el **Anexo 1**. La estrategia para la detección de los VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 a partir del gen L1 se describe a continuación.

La etapa de **diseño** del Biochip de DNA comprendió el análisis y evaluación *virtual* o *“in silico”* de un grupo de oligonucleótidos propuestos para la detección y tipificación de VPH de alto riesgo mediante el reconocimiento específico de secuencias virales presentes en el gen L1. Durante la **estandarización** se evaluó la funcionalidad del diseño previamente propuesto a partir de secuencias de DNA de origen sintético que simulaban la región viral de interés como una primera prueba de viabilidad de nuestro sistema. Esta etapa permitió explorar en verdaderos ensayos de hibridación el potencial de reconocimiento de las sondas inmovilizadas sobre la superficie del Biochip de DNA por su secuencia complementaria entre un conjunto de secuencias virales de origen sintético y bajo diferentes condiciones experimentales. Este tipo de ensayos es posible determinar de manera anticipada la especificidad de las sondas que conforman el Biochip de DNA en la detección y discriminación específica de secuencias de VPH de alto riesgo, con la posibilidad de optimizar su desempeño previo a la evaluación de las muestras clínicas. Una vez aprobada la funcionalidad del Biochip de DNA en la detección específica de una serie de oligonucleótidos el siguiente paso fue evaluar su potencial en la detección de VPH de alto riesgo en muestras clínicas de pacientes con CC. En ensayos preliminares la **validación** de nuestro sistema incluyó la amplificación de fragmentos específicos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 y su posterior análisis sobre los Biochips de DNA. En algunos casos, la aplicación de otras herramientas moleculares, como la secuenciación automatizada de DNA, permitió confirmar la presencia de tipos específicos de VPH detectados sobre la superficie del Biochip de DNA validando la funcionalidad de nuestro sistema.

#### 8.1.1 Diseño general del Biochip de DNA.

Todos los métodos de detección de DNA del VPH mediante técnicas de biología molecular, independientemente del método utilizado, se basan en la especificidad de la complementariedad entre los ácidos nucleicos (DNA o RNA). En este trabajo aprovechamos la capacidad de la secuencia de DNA para hibridar específicamente con otras secuencias de DNA o RNA y la aplicamos al desarrollo

de un Biochip de DNA que permita distinguir de manera sensible y específica a un grupo de VPH asociados con un mayor riesgo de CC.

Como la base fundamental de los Biochips de DNA es el reconocimiento e hibridación específica entre un conjunto de secuencias de DNA sobre su superficie, el primer paso en el desarrollo del Biochip de DNA fue conocer tres aspectos fundamentales en cada uno de los VPH de interés: 1) el tamaño de su genoma, así como la ubicación y los límites de sus genes, 2) detectar y ubicar aquellas regiones que comparten y aquellas que difieren entre un tipo viral y otro y 3) analizar la viabilidad de ciertas regiones para la detección y tipificación viral.

### 8.1.1.1 Obtención del genoma de los VPH de alto riesgo.

La primer herramienta bioinformática usada fue la base de datos de **Los Alamos** (Los Alamos database, Los Alamos National Laboratory/HPV Sequence Database <http://hvp-web.lanl.gov>) de la cual se obtuvieron los genomas completos de los VPH tipos 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 que serían analizados para el desarrollo del Biochip de DNA. Según esta base de datos, las secuencias obtenidas corresponden a la secuencia de referencia reportada para cada tipo viral. La información referente a cada una de estas secuencias se enlista en la Tabla 14.

El objetivo de obtener desde un principio la secuencia completa de cada uno de los VPH fue profundizar un poco más en sus características moleculares, así como reconocer de manera general aquellas regiones virales con mayor potencial de aplicación durante el desarrollo del Biochip de DNA.

La información molecular que proporcionan estas bases de datos sobre cada uno de los VPH no solo han servido como uno de los principales recursos para recrear la historia de la carcinogénesis cervical, sino que representan la principal fuente de información para el desarrollo de nuevas tecnologías de detección molecular.

Tabla 14. VPH de alto riesgo considerados en el diseño del Biochip de DNA.

VPH	Especie (Group)	NOMBRE (Locus)	Numero de acceso (Accession)	Fuente (Source)	Longitud pb (Length)
16	A9	HPV16R	- - -	CC	7906
18	A7	HPV18R	X05015	CC	7857
31	A9	HPV31	J04353	NIC <sup>1</sup>	7912
33	A9	HPV33	M12732	CC	7909
35	A9	HPV35h	X74477	LC/HPV35Hdna <sup>2</sup>	7879
45	A7	HPV45	X74479	LCR <sup>3</sup>	7858
52	A9	HPV52	X74481	NIC/VPH52DNA <sup>4</sup>	7942
58	A9	HPV58	D90400	CC	7824

<sup>1</sup> = Neoplasia intraepitelial cervical, <sup>2</sup> = DNA clonado a partir de una lesión cervical, <sup>3</sup> = Lesión cervical recurrente, <sup>4</sup> = DNA clonado a partir de una neoplasia intraepitelial cervical.

### **8.1.1.2 Alineamiento múltiple del genoma de los VPH de alto riesgo.**

Una vez que se contó con las secuencias de nucleótidos de los VPH de alto riesgo el siguiente paso fue realizar el análisis molecular. Como nuestro principal interés era identificar regiones dentro del genoma viral que nos permitieran diferenciar un determinado tipo de VPH con un alto nivel de precisión, y a su vez, también conocer y ubicar aquellas regiones compartidas entre ellos, decidimos utilizar herramientas bioinformáticas especializadas en el alineamiento simultáneo de dos o más secuencias, mejor conocidas como programas de alineamiento para múltiples secuencias (del inglés “multiple sequence alignment methods”) las cuales facilitan este tipo de procesos.

En bioinformática el objetivo de cualquier alineamiento es aprovechar al máximo la información funcional y/o estructural por medio de la identificación de similitudes u homologías entre las secuencias analizadas ya sea DNA, RNA o proteínas. Básicamente existen dos tipos de alineamientos, el “pairwise” que consiste en el alineamiento de dos secuencias y el “múltiple” donde más de dos secuencias son alineadas. Estos alineamientos pueden ser globales o locales, en los alineamientos globales, las secuencias pueden ser alineadas a lo largo de toda su longitud, mientras que en los alineamientos locales es posible alinear solo ciertas regiones de interés.

Para realizar el análisis del genoma de los VPH de alto riesgo primero realizamos un alineamiento múltiple de tipo global, donde fue considerado el genoma completo de estos virus. Este alineamiento fue realizado en el programa ClustalW (versión 1.83), considerado el programa para alineamiento de múltiples secuencias más frecuentemente utilizado capaz de calcular la mejor coincidencia para las secuencias analizadas, alineándolas para que las identidades, similitudes y diferencias puedan ser fácilmente identificadas. En general, la principal ventaja de aplicar esta tecnología al diagnóstico molecular del VPH es que facilitó la detección de regiones variables en su genoma las cuales podrían ser utilizadas para diferenciar un tipo viral de otro con un alto nivel de precisión. Un fragmento de este alineamiento es mostrado en la Figura 13.

En los programas de alineamiento múltiple, las secuencias alineadas (en este caso DNA) se escriben con las letras que representan nucleótidos en columnas en las que se insertan espacios para que las zonas con idéntica o similar estructura se alinien. Los alineamientos se representan normalmente con un formato gráfico y de texto. En casi todas las representaciones de alineamientos, las secuencias se escriben en filas de forma que los residuos alineados aparecen en columnas sucesivas. En los formatos de texto, las columnas alineadas contienen caracteres idénticos o similares, estos últimos indicados con sistema de símbolos para secuencias conservadas. En algunos casos se utiliza un asterisco para mostrar identidad entre dos columnas. Otros símbolos menos comunes son la coma para sustituciones conservadas y el punto para sustituciones semiconservadas. Muchos programas de visualización de secuencias utilizan también esquemas coloreados

para mostrar información, en las secuencias de DNA y RNA se le asigna a cada base su propio color. En alineamientos de proteínas, los colores se utilizan para indicar propiedades de los aminoácidos para ayudar en la caracterización de conservación o en una sustitución aminoacídica dada. Cuando se introducen múltiples secuencias la última fila de cada columna suele representar la secuencia consenso determinada por el alineamiento.

ClustalW version	1.83
HPV16REF	AA-----TGTTCAGGACCCACAGGAGCGACCCAGAAAGTTACCACAGTTATGCAC 153
HPV35REF	AAGGTGCGGTATGTTTCAGGACCCAGCTGAACGACCTTACAAACTGCATGATTGTGCAA 159
HPV31REF	CA-----TGTTCAAAAATCCTGCAGAAAACCTCGGAAATTCATGAACTAAGCTC 157
HPV33REF	TA-----TGTTC AAGACTGAGGAAAAACCAGAACATTGCATGATTGTGCCA 158
HPV58REF	TA-----TGTTCAGGACGACAGAGGAGAAACCAGGACATTGCATGATTGTGTCA 159
HPV52REF	CA-----TGTTCAGGATCCAGCAACACGACCCCGGACCCCTGCACGAAATTGTGTGA 151
HPV18REF	GC-----TTTGAGGATCCAACACGGCGACCCCTACAAGCTACCTGATCTGTGCAC 160
HPV45REF	GC-----TTTGACGATCCAAGCAACGACCCCTACAAGCTACCAGATTGTGCAC 157
	* * * * *                      * * * * * * * * *
HPV16REF	AGAGCTGCAAACTATAACATGATATAATATTAGAATGTGTGTACTGCAAGCAACAGTT 213
HPV35REF	CGAGGTAGAAAGAAAGCATCCATGAAATTTGTTGAATTGTGTATACTGCAAAACAAGAATT 219
HPV31REF	GGCATTGGAAATACCCTACGATGAACTAAGATTGAATTGTGTCTACTGCAAAAGGTCAGTT 217
HPV33REF	AGCATTGGAGACAACATAACCAACATTGAACTACAGTGCCTGGAAATGCAAAAAACCTTT 218
HPV58REF	GGCGTTGGAGACATCTGTGCATGAAATCGAATTGAAATGCGTTGAATGCAAAAAAGACTTT 219
HPV52REF	GGTGCTGGAAAGATCGGTGCATGAAATAAGGCTGCAGTGTGTGCAAGTGCAAAAAGAGCT 211
HPV18REF	GGAACTGAACACTTCACTGCAAGACATAGAAATAACCTGTGTATATTGCAAGACAGTATT 220
HPV45REF	AGAATTGAATACATCACTACAAGACGTATCTATTGCCTGTGTATATTGCAAAAGCAACATT 217
	* * *                      * * *                      * * * * * * * * * * * * *
HPV16REF	ACTGCGACGTGAGGTATATGACTTTGCTTTTCGGGATTTATGCATAGTATATAGAGATGG 273
HPV35REF	ACAGCGGAGTGAGGTATATGACTTTGCATGCTATGATTGTGTATAGTATATAGAGAAGG 279
HPV31REF	AACAGAAACAGAGGTATTAGATTTTGCATTTACAGATTTAACAAATAGTATATAGGGACGA 277
HPV33REF	GCAACGATCTGAGGTATATGATTTTGCATTTGCAGATTTAACAGTTGTATATAGAGAGGG 278
HPV58REF	GCAGCGATCTGAGGTATATGACTTTGTATTTGCAGATTTAAGAAATAGTGTATAGAGATGG 279
HPV52REF	ACAACGAAGAGAGGTATACAAGTTTCTATTTACAGATTTACGAATAGTATATAGAGACAA 271
HPV18REF	GGAACTTACAGAGGTATTTGAATTTGCATTTAAAGATTTATTTGTGGTGTATAGAGACAG 280
HPV45REF	GGAACGCACAGAGGTATATCAATTTGCTTTTAAAGATTTATGTATAGTGTATAGAGACTG 277
	***** * * * *                      ***** * * * * * * *

Figura 13. Alineamiento global del genoma de los VPH de alto riesgo por ClustalW (versión 1.83). En este caso se muestra un fragmento del gen E6 de VPH de alto riesgo.

Los alineamientos de secuencias pueden almacenarse en una amplia variedad de formatos de archivo de texto, muchos de los cuales han sido desarrollados a la vez que el programa del alineamiento. La mayoría de las herramientas bioinformáticas permiten varios formatos de entrada y salida, como el formato FASTA y GenBank.

Con el alineamiento global de los VPH de alto riesgo, fue más fácil identificar regiones conservadas y regiones variables en estos, ubicar a cada uno de sus genes, detectar regiones con posibles inserciones y/o deleciones, generar arboles filogenéticos, se pudo visualizar que entre las regiones con mayor variabilidad están el LCR y los genes E6 y E7, finalmente se facilitó la detección y selección de aquellas regiones con mayor potencial de identificación viral sobre los Biochip de DNA.

Aunque el alineamiento del genoma de los VPH de alto riesgo muestra una alta variabilidad en diversos sitios a lo largo de las secuencias las cuales podrían resultar ideales para la identificación de estos virus sobre los Biochips de DNA, existen algunos otros aspectos importantes que tienen que ser considerados para garantizar su viabilidad en el diagnóstico. Entre estos aspectos, la región o el gen donde estas secuencias se localizan es de suma importancia ya que dependiendo de la eficiencia con la que estos fragmentos puedan o no ser reproducidos mediante técnicas de PCR podrán o no ser utilizadas durante el desarrollo del Biochip de DNA.

Actualmente son muchas las regiones del genoma viral que han sido utilizadas en biología molecular para detectar un gran número de VPH asociados a enfermedades. Las regiones más ampliamente utilizadas en estudios clínicos y epidemiológicos son el LCR y los genes E6, E7 y L1, aunque otros genes como el E2, E1 y E5 también han sido reportados, pero al no ser aplicados con frecuencia en la práctica clínica, aún no se cuenta con datos suficientes que sustenten su eficiencia en el diagnóstico viral [11, 19, 21,31, 78-81].

Una de las razones por las que quizá el LCR o los genes E6, E7 y L1 y no otros genes, sean los más utilizados para identificar a los VPH, se debe básicamente al papel tan importante que desempeñan durante la progresión del CC, por ejemplo; en el LCR, también conocido como región reguladora o de control, se localizan secuencias promotoras de la replicación del DNA viral y secuencias promotoras y potenciadoras de la transcripción (enhancer); por otro lado, la expresión de las proteínas codificadas por los genes E6 y E7, además de participar en procesos de transformación viral mediante su unión a las proteínas celulares p53 y Rb desregulando el crecimiento celular e inhibiendo la apoptosis, son las responsables de la capacidad oncogénica de los VPH; o bien el gen L1 que además de codificar para la proteína principal de la cápside, representa una de las secuencias mejor conservadas entre los VPH sobre la cual se han realizado un gran número de estudios filogenéticos y en base a la cual son clasificados actualmente los VPH.

Otra de las causas por la que algunos genes son más utilizados en el diagnóstico molecular de los VPH que otros, es probablemente la viabilidad de sus secuencias en las diferentes alteraciones cervicales. Por ejemplo, se ha reportado que en algunos casos como HGSIL y CC (donde el DNA viral esta casi siempre integrado en los cromosomas celulares), existe una pérdida del gen E2 y de las proteínas codificadas por el (E4 y E5) a causa de que en esta región ocurre generalmente la

ruptura del genoma viral. Aunque la mayoría de los estudios reportan la integración del genoma viral y el rompimiento del gen E2 en casi todas las líneas celulares derivadas de CC, en el caso de los VPH 16 y 18 se ha podido identificar DNA viral tanto de forma episomal como de forma integrada y son los únicos casos donde se han podido realizar estudios de variabilidad genética a partir del gen E2 en variantes para estos tipos virales [31, 82-85]. Estos hechos reducen la posibilidad de utilizar el gen E2 en el diagnóstico molecular de los VPH debido a que su detección podría depender del tipo de alteración cervical y del tipo viral.

Sin duda alguna, muchas pueden ser las razones por las que se decida usar un gen en particular para identificar a los VPH, sin embargo considero que entre las razones más importantes que tenemos para usar estas regiones y no otras es que, en el caso del LCR y de los genes E6 y E7 se reporta una alta variabilidad genómica, esta variabilidad incrementa la posibilidad de identificar con mayor precisión un tipo viral en específico e identificar variantes virales con mayor riesgo de progresión neoplásica, mientras que en el caso del gen L1 por ser un gen muy bien conservado entre los VPH, resulta ser muy adecuado para realizar estudios de filogenia y clasificación viral, aunque sin duda ha sido uno de los más ampliamente utilizados para la detección molecular del VPH mediante un gran número de estrategias moleculares.

De acuerdo con el objetivo de nuestro trabajo, dos aspectos fundamentales fueron considerados antes de definir la región del genoma viral que sería utilizada para implementar el Biochip de DNA, en primer lugar tendría que ser una región con la variabilidad suficiente para diferenciar un tipo viral de otro y la segunda, tendría que contener regiones conservadas que facilitarían su amplificación por PCR con el mismo nivel de sensibilidad y especificidad para cada uno de los VPH de interés. En función de estos aspectos se decidió que el gen L1 constituye una región ideal sobre la cual es factible desarrollar el Biochip de DNA ya que a pesar de ser un gen muy bien conservado contiene secuencias con la variabilidad suficiente para identificar y/o diferenciar de manera específica un tipo viral de otro, contiene regiones con una alta homología que hace factible la amplificación simultánea de más de un tipo viral por técnicas de PCR, representa una región que generalmente es detectada tanto en tejido cervical normal, como en cualquier otro tipo de alteración cervical (ASCUS, LGSIL, HGSIL y CC), además de ser una de las regiones más ampliamente estudiada lo que permite analizar y mejorar las estrategias actuales en beneficio de una mayor calidad en el diagnóstico.

El LCR y los genes E6 y E7 no fueron considerados por el momento para la implementación del Biochip de DNA, básicamente debido a que su elevada variabilidad genómica conlleva dificultades para la amplificación simultánea de más de un tipo viral, un proceso esencial durante el desarrollo del Biochip de DNA.

### 8.1.1.3 Alineamiento múltiple del gen L1 de los VPH de alto riesgo.

Una vez que se definió que el Biochip de DNA sería desarrollado en base al reconocimiento específico de secuencias presentes en el gen L1 de los VPH de alto riesgo, se hizo una búsqueda de las regiones del gen que comúnmente son utilizadas para la detección de los VPH de alto y bajo riesgo. De estas regiones, quizás las más conocidas y las que más información han proporcionado acerca de la filogenia y epidemiología de estos virus son, un fragmento de aproximadamente 450 pb amplificado por técnicas de PCR con los iniciadores MY09/11 y su versión mejorada los PGMY09/11 y un producto de PCR de aproximadamente 150 pb obtenido a partir de los iniciadores GP5/6 y su versión mejorada GP5+/6+. Finalmente un pequeño fragmento de tan solo 65 pb amplificado mediante los iniciadores SPF's los cuales permiten detectar un gran número de VPH de alto y bajo riesgo, también ha sido utilizado con gran éxito sobre todo en aquellas muestras donde el DNA de la muestra está severamente dañado, como es el caso del DNA proveniente de tejido incluido en parafina o aquel que ha sido almacenado durante largos periodos de tiempo [41, 78, 81, 87] (Ver Figura 14).

Como el Biochip de DNA requería la selección de regiones variables que usadas como sondas permitieran la detección específica de VPH de alto riesgo y regiones conservadas que facilitarían su amplificación simultánea por técnicas de PCR, inicialmente decidimos valorar la región obtenida a partir de los PGMY09/11, la de los GP5+/6+ y la de los SPF's como posibles opciones para su desarrollo.

Según el análisis derivado del alineamiento múltiple, la región de los PGMY09/11 representa una región con la suficiente variabilidad genética para diferenciar un tipo viral de otro, además de contener regiones lo suficientemente homólogas para facilitar su amplificación por PCR, ambas características resultan ideales para considerarla durante el desarrollo del Biochip de DNA, sin embargo existen dos características que limitan su aplicación; la primera es que debido a la longitud de su secuencia no resulta tan efectiva la amplificación en aquellas muestras donde el DNA está muy dañado o bien procede de tejido incluido en parafina, que por lo general, suele estar muy degradado, además se sabe que la eficiencia de la PCR disminuye conforme se incrementa el tamaño del amplificado; la segunda es que sus iniciadores reportan diferentes afinidades por su secuencia blanco, lo que puede favorecer la amplificación de unos tipos virales sobre otros que también estén presentes en la muestra. Ambas cosas pueden tener un impacto significativo en los índices de detección viral [5, 9, 19, 41]. En cuanto a la región de los GP5+/6+, si bien resuelve el problema del tamaño del amplificado al ser hasta dos veces más pequeña que la obtenida por los PGMY09/11 también presenta problemas de sensibilidad, además su región de mayor variabilidad, ideal para ser usada como sondas en la detección viral, se encuentra muy cercana al sitio de reconocimiento de uno de los iniciadores, lo que para fines de validación por secuenciación representaría la pérdida de las primeras bases de la secuencia. Con respecto al fragmento obtenido mediante los SPF's mencionaremos que según nuestro alineamiento resulta ser una región con una variabilidad genética muy limitada donde en ocasiones solo un par de bases puede ser la diferencia

entre un tipo viral y otro (sobre todo entre aquellos virus filogenéticamente relacionados), una similitud tan alta aunque puede resultar ideal en procesos de amplificación, también incrementa la posibilidad de hibridaciones inespecíficas entre las secuencias virales [15, 81-87].

Aunque las regiones amplificadas con los PGMY09/11, GP5+/6+ y SPF's proporcionan algunas características ideales para el desarrollo del Biochip de DNA, ninguna lo hace de manera totalmente satisfactoria, sin embargo, como la región representa una importante fuente de información filogenética, epidemiológica y molecular, decidimos evaluar la posibilidad de incluirlas durante la detección y tipificación de los VPH pero esta vez, sobre Biochips de DNA.

Como el Biochip de DNA requiere de regiones con una alta variabilidad y regiones muy similares, decidimos usar como región de reconocimiento viral un fragmento que no fuera tan grande como el que se obtiene con los PGMY09/11, pero con la variabilidad suficiente para poder diferenciar un tipo viral de otro. Este fragmento inicia en el sitio de reconocimiento del iniciador PGMY11, cubre completamente la región amplificada por los GP5+/6+ y los SPF's y con cerca de 190 pb termina justo en el sitio de reconocimiento del iniciador GP6+ (Ver Figura 14).

Una vez definida la región que sería usada para el desarrollo del Biochip de DNA, nuevamente se realizó un alineamiento múltiple pero ahora de tipo local, donde solo el área de interés en cada uno de los VPH fue considerada. Esta vez el alineamiento se llevo a cabo en el programa T-Coffee (versión 4.71) (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>), el cual resulta ser más preciso que el ClustalW, aunque un poco más lento, pero con la posibilidad de alinear hasta 100 secuencias de DNA, RNA o proteínas de hasta 2000 bases de largo. T-Coffee ofrece dos modos de alineamiento, uno regular y otro avanzado, en el modo regular el usuario solo necesita pegar sus secuencias en formato fasta, correr el programa y esperar el resultado, mientras que en el modo avanzado el usuario es libre de elegir entre una gama de parámetros computacionales y formatos de salida. Nosotros decidimos usar el modo avanzado con la finalidad de optimizar el alineamiento de las secuencias virales (Ver Figura 15).

El alineamiento de la región de interés mediante el programa T-Coffee muestra el alineamiento en un código de color donde las regiones con una variabilidad alta se muestran en azul y verde, mientras que aquellas con mayor similitud van del amarillo al rojo. Durante el desarrollo del Biochip de DNA las regiones en verde fueron consideradas para ser usadas como sondas, mientras que aquellas que van del rojo al amarillo fueron consideradas para ser usadas como iniciadores. Después de definir el área que sería usada como sondas de detección y tipificación viral, así como la región de los iniciadores, el siguiente paso fue evaluar en cada uno de las secuencias virales un conjunto de parámetros moleculares y termodinámicos que garantizaran el reconocimiento específico de las sondas por su secuencia complementaria, la estabilidad de su unión, la detección de posibles hibridaciones inespecíficas y en el caso de los iniciadores, una afinidad similar entre los diferentes iniciadores por su tipo viral.



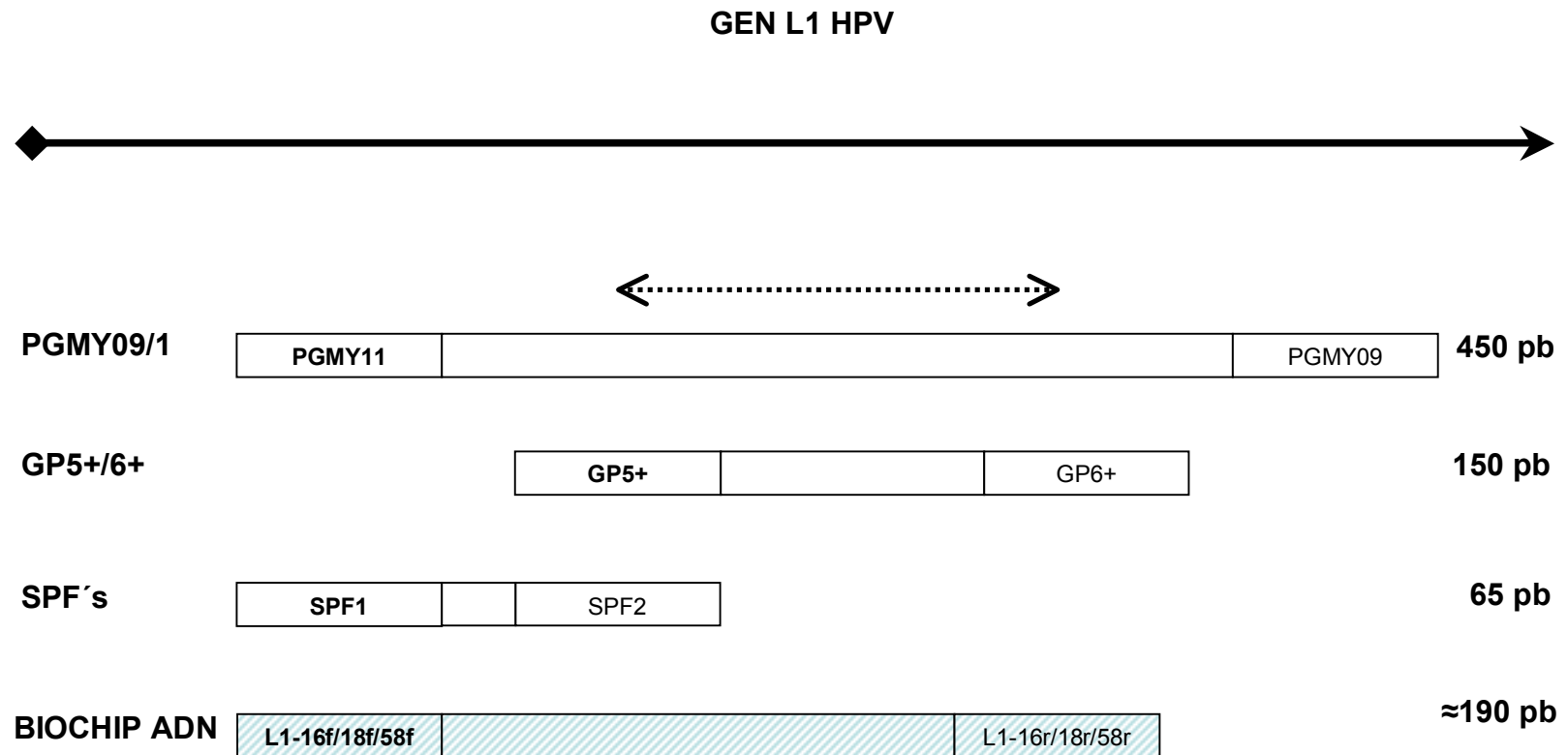


Figura 14. Regiones del gen L1 que han sido utilizadas en el diagnóstico molecular de los VPH. En azul se resalta la región de interés para el desarrollo del Biochip de DNA dirigido a la detección y tipificación de los VPH de alto riesgo en CC.



```

GTCTTCTAGTGACAGTACATATAAAAATGACAATTTTAAGGAATATTTAAGGCATGGTGAAGAATATGATTACAGTTTATTTTC184
HPV45_L1ref 94TCTACACAAAATCCTGTGCCAAGTACATATGACCCTACTAAGTTTAAGCAGTATAGTAGACATGTGGAGGAATATGATTACAGTTTATTTTC187
HPV52_L1ref 94GAGGT---T---AAAAAGGAAAGCACATATAAAAATGAAAATTTTAAGGAATACCTTCGTCATGGCGAGGAATTTGATTACAATTTATTTTC181
HPV58_L1ref 97GAAGT---AACT---AAGGAAGGTACATATAAAAATGATAATTTTAAGGAATATGTACGTCATGTTGAAGAATATGACTTACAGTTTGTTTTC184
cons      97          ** * * * ** ***** * ** * ***** ** ***** *** * ** *** * *****190

```

Figura 15. Alineamiento del gen L1 de los VPH de alto riesgo mediante el programa T-Coffee (versión 4.71). El código de color en el alineamiento representa en azul y verde las regiones con una alta variabilidad, mientras que las amarillas, naranjas y rojas muestran regiones de gran similitud entre los diferentes VPH (<http://igs-server.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee.cgi/index.cgi>).

#### **8.1.1.4 Estrategia de detección de VPH de alto riesgo sobre Biochips de DNA.**

En general, todos los sistemas de detección que han sido desarrollados sobre Biochips de DNA permiten la detección de la hibridación a través del marcaje de los productos de PCR con moléculas reporteras marcadas con Cy3, Cy5, biotina, etc. Cuando el DNA blanco esta presente en concentraciones equimolares altas (por ejemplo las reacciones de PCR), basta una sola molécula por DNA blanco, pero cuando el DNA blanco es menos abundante quizá sea necesario incorporar más de una molécula reportera o incrementar la intensidad de la señal mediante amplificaciones enzimáticas. Más de una molécula reportera puede ser incorporada a la secuencia blanco mediante nick translation, random priming o incorporación química. Las señales de hibridación entre el DNA blanco y las sondas inmovilizadas sobre los Biochips son posteriormente captadas con escaners fluorescentes o por phosphoimager (para arreglos basados en membranas donde generalmente el marcaje es radiactivo).

Hasta el momento la gran mayoría de los sistemas de detección de VPH sobre Biochips de DNA, utiliza moléculas fluorescentes (básicamente nucleótidos marcados con Cy3 o Cy5) para marcar el DNA blanco durante el proceso de amplificación por PCR y poder identificar la hibridación [58-66, 70-73]. Otras alternativas basadas en inmunodetección y detección bioelectrónica también han sido reportadas, aunque casi no son utilizadas (67, 69). Una de las estrategias más recientes propone el uso de iniciadores marcados con Cy3 o Cy5 para realizar la detección viral, de tal manera que el DNA blanco sea marcado durante el proceso de amplificación evitando pasos adicionales derivados del marcaje con otras moléculas reporteras que además, resultan ser más costosas. Esta estrategia supone un sistema más eficiente al optimizar las etapas de marcaje y reducir los costos derivados del procesamiento de las muestras [68]. Aunque todas estas estrategias representan un esfuerzo por generar sistemas diagnósticos más eficientes, la búsqueda todavía continua ya que aun no existe un sistema que garantice la detección y tipificación de los VPH de manera completamente satisfactoria al menos en términos de sensibilidad y especificidad.

Al igual que ocurre con la citología, la calidad del análisis de DNA está condicionado por una serie de factores técnicos y de conservación de la muestra que en ocasiones son determinantes para el resultado. Cada una de las técnicas descritas detecta un rango diferente de VPH y generalmente para el grupo común de VPH detectados por todas las técnicas, las diferencias en sensibilidad y especificidad aun son muy variables.

Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos sobre Biochips continúan en constante desarrollo en la búsqueda de alternativas que faciliten un diagnóstico preciso y bajo costo que además pueda ser sustentable tanto en investigación como en estudios clínicos y epidemiológicos. Nuestro grupo de trabajo ha venido desarrollando una novedosa estrategia para la detección de señales de hibridación sobre microarreglos de oligonucleótidos conocidos como sistemas genesensor (genesensor array). El sistema genesensor aplica técnicas de hibridación múltiple

conocidas como “hibridación en tándem” o “hibridación con alineamiento contiguo” como una alternativa muy eficiente en la identificación de mutaciones [88].

Mientras que en los microarreglos de oligonucleótidos convencionales la secuencia interrogada o DNA blanco es sometido directamente a hibridación sobre un conjunto de sondas inmovilizadas sobre la superficie del array, en el sistema genesensor, el DNA blanco es previamente alineado con un par de secuencias complementarias previamente marcadas denominadas oligonucleótidos estabilizadores (hibridación en tándem). Los oligonucleótidos estabilizadores reconocen una región contigua al sitio de reconocimiento de la sonda en el DNA blanco formando lo que se conoce como un duplex parcial, donde solo el espacio que corresponde al tamaño de la sonda de captura es libre para poder hibridar con ellas sobre la superficie del array. Algunas de las ventajas que proporciona la hibridación en tándem sobre la hibridación tradicional son: el uso de secuencias cortas favorece la discriminación de mutaciones puntuales, el uso de oligonucleótidos estabilizadores evitan la formación de estructuras secundarias en el DNA blanco que pudieran interferir con el sitio de reconocimiento de la sonda, incrementando su estabilidad y la posibilidad de hibridar de manera específica con su secuencia complementaria, además brinda la posibilidad de detectar la hibridación ya sea mediante el marcaje del DNA blanco o bien, de los oligonucleótidos estabilizadores con la posibilidad de incrementar el potencial de detección sobre los microarreglos [90].

Hasta ahora el sistema genesensor ha permitido detectar y discriminar de manera confiable puntos de mutación en el codon 634 del proto-oncogen RET a partir de sondas con tan solo 7 bases de longitud [89]. También han facilitado la detección de los nueve puntos de mutación más frecuentes en los codones 248, 249 y 273 del gen TP53, demostrando una vez más que el uso de pequeñas sondas (7 bases) combinadas con técnicas de PCR y estrategias de hibridación múltiple, permiten identificar mutaciones comunes en DNA proveniente de distintas fuentes. En este tipo de tecnologías, la adecuada selección de sondas, puede resultar en sistemas altamente específicos que pueden ser aplicados con seguridad como herramienta diagnóstica en la detección de mutaciones de forma rápida y precisa [90].

Debido al potencial de estos sistemas en la detección de mutaciones puntuales, recientemente fueron aplicados con gran éxito en la detección molecular de las variantes Asiático Americana (AA) y Europea (E) del VPH 16 asociadas a un mayor riesgo de CC en mujeres mexicanas. La detección y discriminación de estas variantes virales se realizó en base al uso de un conjunto de sondas de entre 9 y 10 bases de longitud capaces de identificar de manera específica tres puntos de mutación en la secuencia del gen E6 (ntd 145, 183 y 350). En este caso las sondas que conformaron el Biochip de DNA fueron seleccionadas con la ayuda de diversas herramientas bioinformáticas que permitieron valorar su funcionalidad en el reconocimiento específico de su secuencia complementaria en sistemas de hibridación virtual (*in silico*). Su especificidad también fue evaluada mediante la detección de secuencias de DNA blanco complementario de origen sintético que

simularon la secuencia viral de interés. Después de valorar la efectividad de las sondas seleccionadas en la detección de las variantes AA y E del VPH 16 en sistemas de hibridación virtual y a partir del uso de DNA sintético, estas fueron sometidas a la detección de variantes virales en secuencias de DNA blanco positivo para VPH 16 previamente alineadas a oligonucleótidos estabilizadores marcados con  $\gamma P^{32}$ . Según nuestros resultados, este tipo de Biochip de DNA hizo posible la detección específica de las variantes AA y E del VPH 16 mediante el uso de pequeñas sondas que permitieron el reconocimiento y discriminación de tres puntos de mutación en el gen E6 con una elevada sensibilidad y a un bajo costo, abriendo la posibilidad de ser usado como herramienta diagnóstica confiable [93].

De acuerdo con las ventajas que ofrece la aplicación de técnicas de hibridación múltiple y el uso de oligonucleótidos estabilizadores a la detección específica de secuencias de DNA viral, nosotros propusimos una novedosa alternativa para la detección molecular de los VPH de alto riesgo en CC que incluye el uso de ambas herramientas moleculares. De acuerdo con nuestra estrategia, el diagnóstico molecular del VPH sobre Biochips de DNA, requirió la selección de pequeñas sondas con la suficiente variabilidad genética para distinguir específicamente un tipo viral de otro. Cada una de las sondas fue seleccionada con la ayuda de diversas herramientas bioinformáticas con la finalidad de garantizar el reconocimiento específico de su secuencia complementaria primero en sistemas de hibridación virtual (*in silico*), después en secuencias de DNA blanco de origen sintético que simularon la región viral de interés y finalmente en secuencias de DNA proveniente de líneas celulares positivas para VPH de alto riesgo y de muestras clínicas con CC. Las sondas seleccionadas fueron inmovilizadas sobre laminillas de portaobjetos convencionales representando el Biochip de DNA donde se realizó el diagnóstico molecular de los VPH. La detección de las señales de hibridación entre las sondas inmovilizadas y las secuencias de DNA blanco viral sobre la superficie del Biochip se efectuaron en base al uso de oligonucleótidos estabilizadores cuya secuencia reconoce de manera específica dos regiones, la primera corresponde a su secuencia complementaria en el DNA blanco viral de interés que es contigua al sitio de reconocimiento de las sondas y la segunda es una secuencia complementaria a un pequeño fragmento de DNA marcado con Cy3 denominado reportero universal, responsable final de proporcionar las señales de hibridación. En nuestro caso el uso de oligonucleótidos estabilizadores con estas características representa una novedosa innovación a los sistemas convencionales de detección y tipificación de VPH sobre Biochips de DNA, ya que mientras el oligonucleótido estabilizador contenga la secuencia de reconocimiento del reportero universal marcado prácticamente permite la detección de cualquier tipo viral sobre este tipo de plataformas, con la ventaja adicional que resulta de usar solo una secuencia marcada con Cy3 para la detección de cualquier tipo de VPH, que marcar un número indeterminado de secuencias de DNA blanco viral o iniciadores específicos para VPH, esto sin considerar que además, el uso del oligonucleótido estabilizador favorece la detección y tipificación específica de los VPH al proporcionar una mayor estabilidad a la secuencia de DNA blanco e incrementar la posibilidad de que este duplex parcial encuentre su sonda

complementaria en la superficie del Biochip de DNA. Todas estas ventajas que ofrece el Biochip de DNA aplicadas a la detección y tipificación de VPH pueden representar una herramienta diagnóstica muy eficiente en la práctica clínica y en investigación ya que demostró ser muy específica en la identificación viral con costos accesibles y fácil de desarrollar (Ver Figura 16).

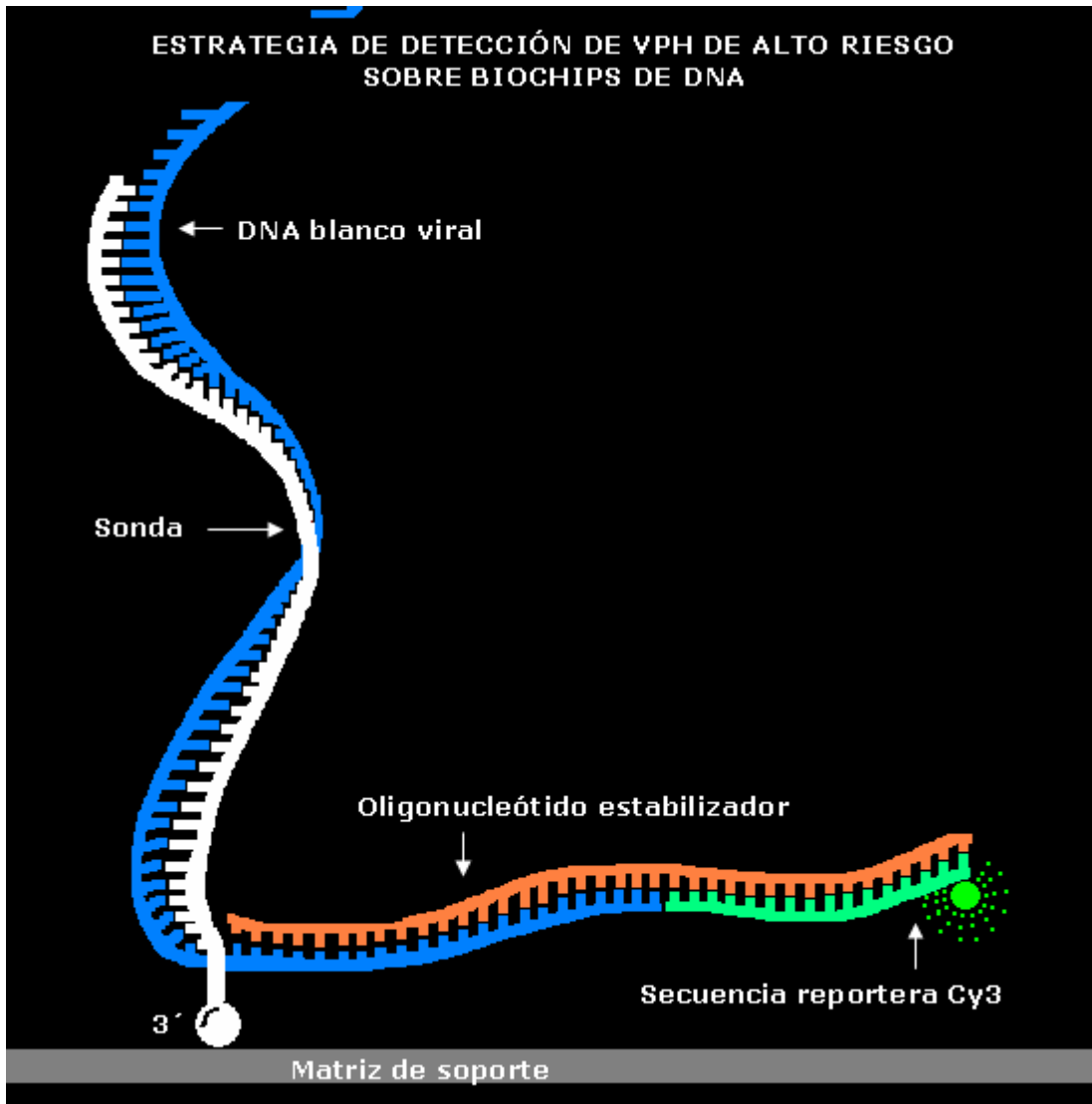


Figura 16. Estrategia de detección de VPH de alto riesgo sobre Biochips de DNA. Se muestra la matriz de soporte (gris) sobre la cual se inmovilizaron las sondas (blanco) que conformaron los Biochips de DNA usados en la detección y tipificación de VPH de alto riesgo (azul). Las señales de hibridación viral sobre los Biochips de DNA fueron visualizadas mediante técnicas de hibridación múltiple que incluyeron el uso de oligonucleótidos estabilizadores (naranja) que reconocen e hibridan simultáneamente con un fragmento del DNA blanco viral (azul) que es contiguo al sitio de reconocimiento de la sonda y con una secuencia reportera marcada con Cy3 (verde) quien finalmente emite fluorescencia que puede ser captada por un microscopio y/o escáner.

#### 8.1.1.4.1 Selección de las sondas.

El reto más grande durante el desarrollo de cualquier tipo de Biochip es la selección de las sondas más adecuadas para identificar un determinado gen dentro de un grupo de secuencias o bien, en un genoma completo con la mayor precisión posible. Para facilitar este proceso un gran número de herramientas bioinformáticas continúan siendo desarrolladas, entre ellas, los programas especializados en el diseño de sondas están generando un gran interés por su aplicación en el diseño y generación de Biochips de DNA, principalmente los de oligonucleótidos (oligoarrays) muy populares por su mayor especificidad, fácil elaboración y costos más accesibles.

La mayoría de los programas especializados en el diseño de sondas e iniciadores son de libre acceso por medios electrónicos y aunque pueden aplicar diversos criterios para la elección de las mejores secuencias todos comparten un fin común mejorar su especificidad. La especificidad es el resultado de un delicado balance entre la secuencia y las propiedades termodinámicas expuestas por los ácidos nucleicos [95]. Estas propiedades termodinámicas pueden potencialmente mejorar el reconocimiento entre las sondas y su secuencia complementaria en proceso de hibridación, además de evitar problemas de hibridaciones no específicas. Los parámetros moleculares y termodinámicos más importantes a ser considerados por la gran mayoría de los programas especializados en el diseño de sondas son: la identidad de la secuencia, el tamaño y composición de los oligonucleótidos, la temperatura de fusión ( $T_m$ ) y la energía libre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ). Estos parámetros son probablemente los mayores indicadores de la estabilidad y la fuerza de unión entre las sondas y sus secuencias complementarias dentro de la compleja dinámica de hibridación [94-98].

Como la eficiencia de los Biochips de DNA es valorada en función de su especificidad, la adecuada selección de sondas que conformaran el sistema es una etapa crucial en su desarrollo. Para garantizar la eficiencia del Biochip de DNA para la detección y tipificación molecular de VPH de alto riesgo en CC se usaron dos programas bioinformáticos que permiten el análisis y el reconocimiento específico de secuencias genómicas, el **OligoAnalyzer** Versión 3.0 (Integrated DNA Technologies) y el **BLAST** (Basic Local Alignment Search Tool/GenBank Database).

Como en alineamientos previos ya se había definido la región de interés del gen L1 de los VPH de alto riesgo que podría ser usada como sonda para identificar los diferentes tipos virales (Ver Figura 15), el siguiente paso fue evaluar su verdadero potencial en la detección viral específica con ayuda de los programas **OligoAnalyzer** y **BLAST**, quienes en base al cálculo de determinados parámetros moleculares y termodinámicos pueden determinar la especificidad de una secuencia de oligonucleótidos por su secuencia complementaria en procesos de hibridación.



Como la región seleccionada para el diseño del Biochip de DNA (entre 19 y 30 bases) representa una de las regiones con la mayor variabilidad encontrada dentro del fragmento del gen L1 propuesto para la detección viral, se propuso usarla como sonda para la identificación de los VPH de alto riesgo, cuyo tamaño solo sería modificado de acuerdo con los parámetros moleculares y termodinámicos necesarios para optimizar su eficiencia en la detección y tipificación viral. De esta manera, un total de ocho secuencias de oligonucleótidos fueron evaluadas para ser usadas como sondas durante el desarrollo del Biochip, una por cada VPH de alto riesgo (Ver Tabla 9 y Figuras 15 y 17 a 35).

El primer programa se usó para determinar el tamaño y la composición ideal de las secuencias que serían usadas como sondas para la detección de VPH de alto riesgo fue el **OligoAnalyzer** versión 3.0 (Integrated DNA Technologies <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Este programa representa una poderosa herramienta de análisis molecular ya sea para pequeños oligonucleótidos o para grandes secuencias de DNA con la ventaja de proporcionar información acerca de todas las posibles interacciones moleculares que pueden ocurrir entre las secuencias que están siendo analizadas de acuerdo con la composición de su secuencia y el cálculo de parámetros termodinámicos en ensayos de hibridación virtual o "*in silico*".

El **OligoAnalyzer** esta compuesto de una serie de subprogramas especializados como el **Analyze**, el **Hairpin**, el **Self-dimer**, el **Hetero-Dimer**, el **NCBI blast**, el **TM Mismatch** y el **LNA conversión**. Algunas de estas herramientas como el **Analyze** proporcionan información molecular importante sobre la secuencia que esta siendo analizada como la composición de su secuencia complementaria, su longitud, el contenido de G-C, su peso molecular, etc. El **Self-Dimer** y el **Hetero-Dimer** son dos herramientas que con base en la composición de las secuencias y en el cálculo de algunos parámetros termodinámicos como la  $T_m$  y la  $\Delta G$  (energía libre de Gibbs o entalpía libre) son capaces de predecir la condición de equilibrio y de espontaneidad para que una reacción química ocurra, es decir, a partir de estos parámetros es posible determinar la fuerza de unión con que una sonda es capaz de hibridar consigo misma, como es el caso de **Self-Dimer**, o bien, con su secuencia complementaria u otras secuencias involucradas que pudieran estar presentes durante los procesos de hibridación, como es el caso del **Hetero-Dimer**.

La información que proporcionan estos programas resulta de gran relevancia sobre todo si se toma en cuenta que la longitud de las sondas ha sido relacionada con su especificidad y con la eficiencia de de la hibridación. Además, el punto de desnaturalización de un fragmento de DNA aumenta con el tamaño de la secuencia de nucleótidos que lo conforman, y también por la composición de nucleótidos de la secuencia, que suele aumentar con altos contenidos de Guanina (G) y Citocina (C), aumentando la probabilidad en el incremento de secuencias que lleven consecutivamente G o C. Hay relaciones derivadas de esta relación: secuencias ricas en GC tienen, con sus secuencias de bases complementarias, apareamientos más espontáneos (fenómeno conocido en inglés como Base Stacking) ya que en estos casos, tienen energía de Gibbs más negativa y por tal

motivo aumenta la temperatura mínima de fusión (o desnaturalización en este caso, conocido en Inglés con la abreviatura  $T_m$ ) de la secuencia de DNA [94-98].

En función de la información que proporciona el programa **OligoAnalyzer** para la adecuada selección de sondas, cada una de las secuencias propuestas para la detección específica de los VPH de alto riesgo fueron sometidas primero al subprograma **Analyze** el cual nos proporcionó información relevante acerca de la composición de sus secuencia como tamaño, contenido de G-C,  $T_m$ , etc. Esta información fue determinante para establecer el tamaño final de cada una de las sondas, el cual fue definido en función de  $T_m$  similares, lo cual confiere una mayor probabilidad de hibridar específicamente con su secuencia complementaria, que sondas con diferentes  $T_m$  durante los procesos de hibridación. Finalmente, después de evaluar una y otra vez las secuencias hasta encontrar aquellas con valores similares de  $T_m$ , un total de 8 sondas denominadas 16-SN, 18-SN, 31-SN, 33-SN, 35-SN, 45-SN, 52-SN y 58-SN de entre 19 y 24 bases y con valores de  $T_m$  entre 52 y 57 °C fueron seleccionadas para conformar el Biochip de DNA que sería dirigido al diagnóstico molecular de VPH de alto riesgo en CC (Ver Tabla 9).

Una vez que se determinó la longitud de cada una de las secuencias que serían usadas como sondas en la detección molecular de VPH de alto riesgo sobre los Biochips de DNA, el siguiente paso fue evaluar algunas otras propiedades en estas secuencias como su composición. La composición de bases de una secuencia de oligonucleótidos que será usada como sonda es fundamental para asegurar el reconocimiento específico de su secuencia complementaria en el DNA blanco. Es muy importante evitar la elección de aquellas secuencias que de acuerdo a su composición de bases puedan formar estructuras secundarias o estructuras parciales de doble cadena que puedan intervenir con el reconocimiento específico de la secuencias de DNA blanco durante los procesos de hibridación. Para ello es necesario elegir como sondas solo aquellos oligonucleótidos que no contengan regiones de auto-homología u homología intra-oligonucleótido que pueden favorecer la formación de pequeños pliegues o bien, dímeros muy estables que puedan interferir con el reconocimiento de la secuencia complementaria en un DNA blanco de interés.

Para verificar si las sondas seleccionadas no presentaban problemas de auto-homología o auto-complementaridad que les permitieran formar estructuras secundarias o ciertos dímeros estables que pudieran interferir con el reconocimiento específico de su secuencia complementaria en el DNA blanco durante los procesos de hibridación, cada una de ellas fue analizada con el **Self-Dimer** una herramienta que permite determinar posibles interacciones entre las secuencias analizadas mostrando las principales bases involucradas y la fuerza de unión con la que estas podrían ocurrir, todo en un ambiente de “*hibridación virtual*” (Ver Figuras 17 y 18).



Figura 17. Evaluación de auto-homología de las sondas propuestas para la identificación molecular de los VPH 16, 18, 31 y 33 según el Self-dimer del programa OligoAnalyzer Versión 3.0. El Maximum Delta G representa la fuerza máxima de unión entre la sonda y su secuencia complementaria en el DNA blanco (Dimer-Sequence). En la parte baja se muestra uno de los sitios más probables donde cada una de las sondas seleccionadas pueden llegar a interactuar consigo misma en un ambiente de hibridación virtual, se muestra la fuerza de unión (Delta G) y el número de bases involucradas (Homo-Dimer Analysis). Con esta información es posible determinar si las sondas seleccionadas pueden llegar a formar dímeros estables que pudieran interferir con el reconocimiento específico de su secuencia complementaria en un DNA blanco durante los procesos de hibridación.



Figura 18. Evaluación de auto-homología de las sondas propuestas para la identificación molecular de los VPH 35, 45, 52 y 58 según el Self-dimer del programa OligoAnalyzer Versión 3.0. El Maximum Delta G representa la fuerza máxima de unión entre la sonda y su secuencia complementaria en el DNA blanco (Dimer-Sequence). En la parte baja se muestra uno de los sitios más probables donde cada una de las sondas seleccionadas pueden llegar a interactuar consigo misma en un ambiente de hibridación virtual, se muestra la fuerza de unión (Delta G) y el número de bases involucradas (Homo-Dimer Analysis). Con esta información es posible determinar si las sondas seleccionadas pueden llegar a formar dímeros estables que pudieran interferir con el reconocimiento específico de su secuencia complementaria en un DNA blanco durante los procesos de hibridación.

Según la información que proporciona el **Self-Dimer** del programa OligoAnalyzer versión 3.0, las ocho sondas denominadas 16-SN, 18-SN, 31-SN, 33-SN, 35-SN, 45-SN, 52-SN y 58-SN que proponemos para detectar y tipificar VPH de alto riesgo en CC sobre Biochips de DNA, no presentan problemas de auto-homología o auto-complementaridad que pudieran interferir con el reconocimiento de su secuencia complementaria en el DNA blanco viral, pues si comparamos la fuerza de unión calculada para las sondas cuando reconocen específicamente a su secuencia complementaria ( $\Delta G = -31.95$  a  $-40.32$ ) y los comparamos con las calculadas en aquellos casos donde puede ser posible la interacción de las sondas consigo mismas ( $\Delta G = -3.91$  a  $-19.46$ ), estas resultan ser mucho más bajas lo que elimina la probabilidad de que estas interacciones puedan llegar a ocurrir entre las sondas durante un estricto procesos de hibridación. En general, entre mas negativo sea el valor del Delta G, mayor será la fuerza de unión entre la sonda con su secuencia complementarias, valores menos negativos solo representan uniones débiles que difícilmente pueden llegar a ocurrir entre las secuencias involucradas. De esta manera podemos asegurar que al menos en evaluaciones “in silico” ninguna de las sondas que conformaron el Biochip de DNA presenta problemas de auto-homología o auto-complementaridad entre ellas que pudiera interferir en la detección de su secuencia complementaria en un DNA blanco viral durante los procesos de hibridación (Ver Figuras 17 y 18).

Como ya evaluamos la posibilidad de que las sondas formaran dímeros estables que pudieran intervenir con el reconocimiento específico de secuencias complementarias durante los procesos de hibridación, el siguiente paso fue evaluar su potencial para reconocer e hibridar de manera específica con su secuencia complementaria en un DNA blanco, o bien con otras secuencias que pudieran estar presentes durante los procesos de hibridación. Para evaluar este aspecto tan importante que finalmente permitió definir de manera anticipada la especificidad de nuestro sistema en la detección y tipificación de VPH de alto riesgo, cada una de las sondas fue sometida a un análisis más pero esta vez en el **Hetero-Dimer**, una herramienta más del **OligoAnalyzer** Versión 3.0 que nos permite calcular tanto la fuerza de unión entre dos secuencias sean o no complementarias, así como los sitios más probables donde estas uniones pueden ocurrir a lo largo de un DNA blanco (Ver Figuras 19 a 27).

En este caso cada una de las sondas fue sometida a hibridación con su secuencia de DNA blanco complementario, pero también con el resto de las secuencias virales de interés. De esta manera la sonda 16-SN fue sometida a hibridación con su DNA blanco el HPV16\_L1REF, pero también, con el HPV18\_L1REF, el HPV31\_L1REF, el HPV33\_L1REF, el HPV35\_L1REF, el HPV45\_L1REF, el HPV52\_L1REF, y el HPV58\_L1REF, la sonda 18-SN fue sometida a hibridación con su DNA blanco el HPV18\_L1REF, pero también con el HPV16\_L1REF, el HPV31\_L1REF, el HPV33\_L1REF, el HPV35\_L1REF, el HPV45\_L1REF, el HPV52\_L1REF, y el HPV58\_L1REF y así sucesivamente hasta llegar a la sonda 58-SN la cual finalmente fue sometida a hibridación con su secuencia complementaria el HPV58\_L1REF, pero también con todas las demás secuencias

de interés, el HPV16\_L1REF, el HPV18\_L1REF, el HPV31\_L1REF, el HPV33\_L1REF, el HPV35\_L1REF, el HPV45\_L1REF y el HPV52\_L1REF (Ver Tabla 9 y Figuras 15 y 19 a 27). Debido a la falta de accesibilidad de algunos de los tipos de VPH de interés, en este trabajo solo fue posible validar la funcionalidad de las sondas 16-SN, 18-SN y 58 SN dirigidas a la detección y tipificación específica de tres VPH, el 16, el 18 y el 58 sobre los Biochips de DNA tanto en líneas celulares como en muestras biológicas provenientes de CC. Por este motivo solo se muestran los resultados de especificidad para estas secuencias, los cuales fueron obtenidos a partir del análisis que efectuamos en el subprograma **Hetero-Dimer** (Ver Figuras 19 a 27). Como el análisis “*virtual*” fue realizado para un grupo de 8 tipos de VPH, todas las sondas que fueron propuestas para su detección también pueden ser aplicadas con cierto nivel de confiabilidad en la identificación viral una vez que se cuente con las muestras biológicas necesarias que permitan validar su funcionalidad sobre Biochips de DNA.

De acuerdo con el análisis de especificidad “*virtual*” realizado en el **Hetero-Dimer**, las sondas seleccionadas para la detección de VPH de alto riesgo registraron una alta especificidad por su secuencia complementaria en el DNA blanco sintético y aunque algunas sondas reconocieron parcialmente algunos otros sitios en otras secuencias de DNA blanco viral no del todo complementarias estas uniones reportan bajos valores de Delta G, indicando uniones débiles, no estables, que fácilmente pueden ser disociadas. Según este análisis ninguna de las sondas seleccionadas reporta algún potencial para hibridar de manera específica y estable con alguna otra secuencia viral que no corresponda a su secuencia complementaria al menos en ensayos de *hibridación virtual* (Ver Figuras 19 a 27).

Una vez que se evaluó el reconocimiento específico de las sondas propuestas para la detección precisa de VPH de alto riesgo a través del análisis con el **Hetero-Dimer**, solo nos quedaba garantizar que tanto el tamaño como la composición de las sondas eran suficientes para identificar de forma específica a los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58. Para confirmar una vez más este potencial, cada una de las sondas seleccionadas para la identificación viral fue sometida finalmente al **BLAST** (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) (GenBank Database / NCBI <http://www.ncbi.nih.gov>), una potente herramienta que a través de la comparación de secuencias permite identificar secuencias de genes o genes completos previamente reportados en un determinado organismos (Ver Figuras 28 a 35).

El **BLAST** facilita la detección de regiones de gran similitud entre las secuencias, compara secuencias de nucleótidos o proteínas con las secuencias de una base de datos y calcula la significancia estadística de las coincidencias, generalmente es usado para hacer inferencias funcionales y evolutivas entre las secuencias, así como ayudar a identificar miembros de una familia de genes o bien, identificar secuencias previamente reportadas en algunos microorganismos. Este tipo de herramientas se han desarrollado como una respuesta a las necesidades de obtener más información sobre las secuencias aprovechando el conocimiento

previo almacenado en bases de datos. Este conocimiento almacenado se puede utilizar directa o indirectamente. La utilización directa implica encontrar secuencias similares a la secuencia problema, o secuencias que tengan alguna propiedad común. La utilización indirecta usa la información para obtener reglas que permitan posteriormente predecir, con mayor o menor éxito, propiedades en secuencias nuevas.

Actualmente, las bases de datos de secuencias constituyen la base de todas las herramientas bioinformáticas usadas en análisis de secuencias. Si bien existe un gran número de iniciativas que ha producido un enorme número de bases de datos especializadas, el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y el EBI (<http://www.ebi.ac.uk>) representan dos de los centros más importantes en cuanto a las bases de datos moleculares actualmente disponibles. Estos centros son los encargados de las bases de datos GenBank y EMBL, respectivamente que contienen las secuencias de DNA que se han ido depositando desde su primera versión, que en el caso de EMBL fue en el año 1982 el cual contaba en ese entonces con 568 secuencias. NCBI y EBI intercambian las secuencias de DNA con bastante periodicidad, con lo que se puede considerar que tanto GenBank como EMBL son una buena representación de todas las secuencias conocidas. Derivadas de estas bases de datos de DNA están las correspondientes bases de datos de proteínas correspondientes a los genes: Swissprot, TrEMBL y PIR. Además tienen bases de datos correspondientes a diversos proyectos de secuenciación, incluyendo el genoma humano.

Las herramientas bioinformáticas más usadas en el contexto del análisis de secuencias incluyen métodos de búsqueda de secuencias similares (los programas BLAST y FASTA son los más usados), alineamiento múltiple (CLUSTAL) definición de regiones conservadas con posible significado funcional, o uso de estas regiones para buscar nuevas secuencias y métodos filogenéticos para reconstruir las relaciones evolutivas entre las secuencias. Las secuencias por si mismas no son informativas hasta que no se analizan comparativamente frente a las secuencias existentes en las bases de secuencias, lo que permite elaborar hipótesis sobre su parentesco por homología. Los alineamientos de secuencia proporcionan un método muy valioso para comparar fragmentos de secuencias con genes previamente caracterizados y disponibles en las bases de datos. Mediante búsquedas basadas en alineamientos a través de BLAST 2.0, (Basic Local Alignment Search Tool) puede obtenerse información sobre aspectos funcionales y evolutivos de las secuencias. El algoritmo BLAST detecta, alineamientos locales (cortos) y globales (amplios) e incluso regiones similares incluidas en genes que no tienen relación entre si. Todo ello permite encontrar en un periodo de tiempo corto secuencias similares a la de nuestro interés y conocer su existencia en los bancos de secuencias y predecir el efecto de sondas y oligonucleótidos específicos. BLAST maneja un gran número de programas como blastn, blastp, blastx, tblastn, tblastx, etc., pero entre todas las opciones el blastn y el blastp son las herramientas más utilizadas para búsquedas generales.

Este programa proporciona una página con resultados donde se incluye información sobre la homología encontrada con ciertos genes o familias de genes pertenecientes a un grupo determinado de microorganismos. También proporciona una imagen que representa las zonas en las que se ha encontrado secuencias similares en la base de datos. A continuación aparecen las secuencias ordenadas de mayor a menor similitud y esquemas donde se representa el total de bases que son reconocidas en la base de datos (Ver Figuras 28 a 35). Según el BLAST, las ocho sondas previamente seleccionadas (16-SN, 18-SN, 31-SN, 33-SN, 35-SN, 45-SN, 52-SN y 58-SN) fueron capaces de identificar de manera específica a los tipos virales para los que fueron propuestas (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 respectivamente). De acuerdo con los ensayos de “*hibridación virtual*” realizados a cada una de las sondas, todas resultaron ser muy específicas en la identificación viral.

Con toda esta información, se pudo establecer el diseño general para la identificación molecular de VPH de alto riesgo en CC sobre Biochips de DNA. Este diseño comprende la detección y tipificación viral a partir de “pequeñas” sondas de 19 a 24 ntd capaces de reconocer específicamente un fragmento del gen L1 amplificado por técnicas de PCR de entre 181 y 188 pb (Ver Figura 36). Aunque el diseño del Biochip de DNA abarca a los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58, la falta de muestras biológicas positivas para la mayoría de estos tipos virales propició que por el momento solo se pudieran validar sobre los Biochips de DNA los tipos 16, 18 y 58 tanto en líneas celulares, como en muestras clínicas provenientes de CC. Así que inicialmente, la validación de los Biochip de DNA dirigidos a la detección molecular de VPH de alto riesgo solo incluyó las sondas 16-SN, 18-SN y 58-SN quienes en ensayos de *hibridación virtual* e hibridación con oligonucleótidos que simulan fragmentos virales han demostrado identificar de manera específica a los VPH 16, 18 y 58 (Ver Figuras 17 a 35).



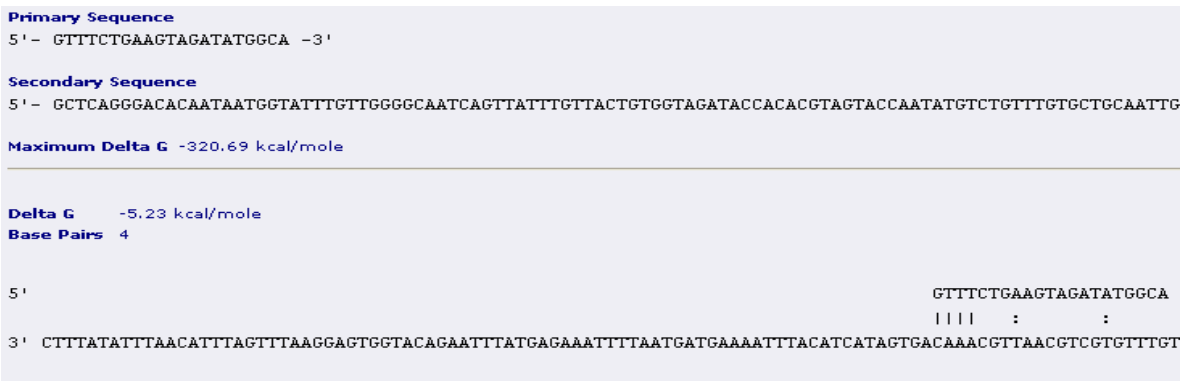
**16-SN vs HPV16\_L1ref****16-SN vs HPV18\_L1ref****16-SN vs HPV31\_L1ref**

Figura 19. Evaluación “*in silico*” de la especificidad de la sonda 16-SN frente a su secuencia complementaria HPV16\_L1ref y otras secuencias virales no complementarias HPV18\_L1ref y HPV31\_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del OligoAnalyzer Versión 3.0. En cada esquema se muestra la secuencia de la sonda (Primary Sequence), la secuencia del DNA blanco viral complementario o no complementario (Secondary Sequence), los valores de Delta G que representan la fuerza de unión entre estas secuencias y finalmente se muestran los sitios donde se da el reconocimiento específico de las sondas por su secuencia complementaria en el DNA blanco viral, así como aquellos sitios que la sonda podría reconocer en otras secuencias virales no complementarias.

**16-SN vs HPV33\_L1ref****Primary Sequence**

5'- GTTTCTGAAAGTAGATATGGCA -3'

**Secondary Sequence**

5'- GCACAAGGTCATAAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAGATACCCACTCGCAGTACTAATATGACTTTATGCACAC.

**Maximum Delta G** -306.88 kcal/mole**Delta G** -6.95 kcal/mole**Base Pairs** 6

```

5'      GTTTCTGAAAGTAGATATGGCA
          |||||
3' CTTTTTGTTTGACATCTAGTATAAGAAAGTTGTACAGAATATATAAGAAATTTTAAAAAGTAAAAATATACATGACAGTGATCAATGAACACACGTA

```

**16-SN vs HPV35\_L1ref**

CGTTCTGTGTGTCTTCTAGTGACAGTACATATAAAAAATGACAATTTTAAAGGAATATTTAAGGCATGGTGAAGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC -3'

GTTTCTGAAAGTAGATATGGCA

: : : |||||

CGCTTTGTGTGTCTGTATAAACATGATGCCCAACATAGTTGATGTCATTGTTTGTAAACCAATGAGGTTGTTTATGGTAATAATACCGGAACACG

**16-SN vs HPV45\_L1ref**

TGCCCTACACAAAATCCTGTGCCAAGTACATATGACCCTACTAAGTTTAAAGCAGTATAGTAGACATGTGGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTTTC -3'

GTTTCTGAAAGTAGATATGGCA

: : : |||||

ATCTCCGTGATTACAAATTAATCATGACGCCCATCACAGGTGATGTCATTGTTTGTGACTAATACGGTTGTTTATGGTAACAATACCGGGACCCG

Figura 20. Evaluación “*in silico*” de la especificidad de la sonda 16-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV33\_L1ref, HPV35\_L1ref y HPV45\_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del OligoAnalyzer Versión 3.0. En cada esquema se muestra la secuencia de la sonda (Primary Sequence), la secuencia del DNA blanco viral complementario o no complementario (Secondary Sequence), los valores de Delta G que representan la fuerza de unión entre estas secuencias y finalmente se muestran los sitios donde se da el reconocimiento específico de las sondas por su secuencia complementaria en el DNA blanco viral, así como aquellos sitios que la sonda podría reconocer en otras secuencias virales no complementarias.

## 16-SN vs HPV52\_L1ref

CTTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAATGAAAATTTTAAGGAATACCTTCGTCATGGCGAGGAATTTGATTTACAATTTATTTTTC -3'

```

                                GTTTCTGAAGTAGATATGGCA
                                : :: : : ||||
TGGAGTCGTGTATTTTCAGTACAATCACGATGCTCACCATAGGTGTTGACACTGTTTGTGACTAACGGGGTTGTATACGGTAATAACACCGGGACGGC

```

## 16-SN vs HPV58\_L1ref

## Primary Sequence

5'- GTTTCTGAAGTAGATATGGCA -3'

## Secondary Sequence

5'- CGTGCACAAGGTCATAACAATGGCATTGCTGGGGCAATCAGTTATTTGTTACCGTGGTTGATACCACTCGTAGCACTAATATGACATTA

Maximum Delta G -327.61 kcal/mole

Delta G -5.86 kcal/mole

Base Pairs 5

```

5'                                GTTTCTGAAGTAGATATGGCA
                                : :: : : ||||
3' CTTTTTGTGACATTCAGTATAAGAAGTTGTAAGTGCATGTATAAGGAATTTTAATAGTAAAAATATACATGGAAGGAATCAATGAAGTCA

```

Figura 21. Evaluación “*in silico*” de la especificidad de la sonda 16-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV52\_L1ref y HPV58\_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del OligoAnalyzer Versión 3.0. En cada esquema se muestra la secuencia de la sonda (Primary Sequence), la secuencia del DNA blanco viral complementario o no complementario (Secondary Sequence), los valores de Delta G que representan la fuerza de unión entre estas secuencias y finalmente se muestran los sitios donde se da el reconocimiento específico de las sondas por su secuencia complementaria en el DNA blanco viral, así como aquellos sitios que la sonda podría reconocer en otras secuencias virales no complementarias.

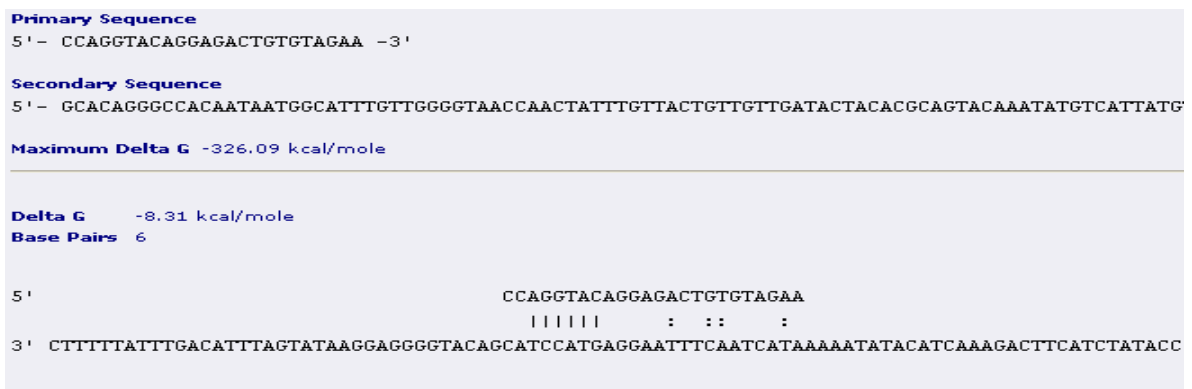
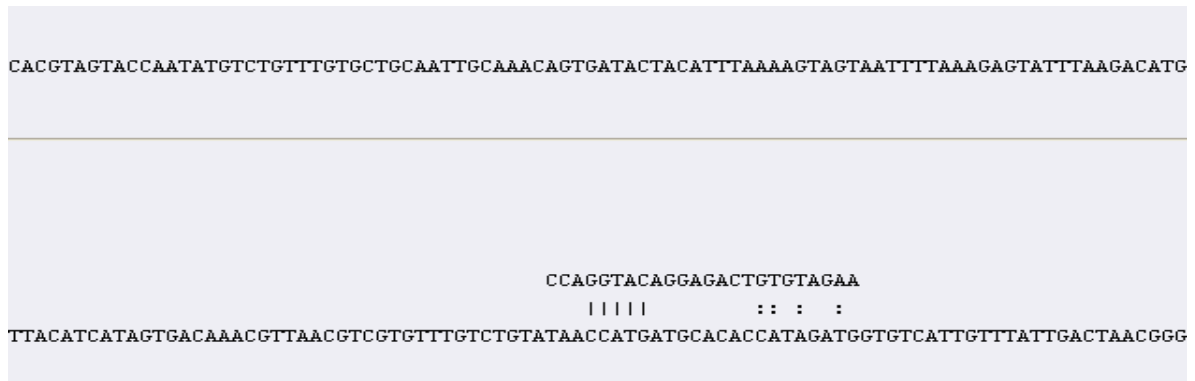
**18-SN vs HPV18 \_L1ref****18-SN vs HPV16 \_L1ref****18-SN vs HPV31 \_L1ref**

Figura 22. Evaluación “*in silico*” de la especificidad de la sonda 18-SN frente a su secuencia complementaria HPV18\_L1ref y otras secuencias virales no complementarias HPV16\_L1ref y HPV31\_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del OligoAnalyzer Versión 3.0. En cada esquema se muestra la secuencia de la sonda (Primary Sequence), la secuencia del DNA blanco viral complementario o no complementario (Secondary Sequence), los valores de Delta G que representan la fuerza de unión entre estas secuencias y finalmente se muestran los sitios donde se da el reconocimiento específico de las sondas por su secuencia complementaria en el DNA blanco viral, así como aquellos sitios que la sonda podría reconocer en otras secuencias virales no complementarias.

**18-SN vs HPV33\_L1ref**

**Primary Sequence**  
5'- CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA -3'

**Secondary Sequence**  
5'- GCACAAGGTCATAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACTAATATGAC'

**Maximum Delta G** -306.88 kcal/mole

---

**Delta G** -7.43 kcal/mole  
**Base Pairs** 6

5' CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA  
: : : | | | | |  
3' CTTTTTGTTTGACATCTAGTATAAGAAGTTGTACAGAATATATAAGAAATTTTAAAAAGTAAAAATATACATGACAGTG

**18-SN vs HPV35\_L1ref**

**Primary Sequence**  
5'- CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA -3'

**Secondary Sequence**  
5'- GCACAAGGCCATAATAATGGTATTTGTTGGAGTAACCAATTGTTTGTACTGTAGTTGATACAACCCGTAGTACAAATATGTC'

**Maximum Delta G** -317.4 kcal/mole

---

**Delta G** -6.24 kcal/mole  
**Base Pairs** 5

5' CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA  
: : : | | | | :  
3' CTTTTATTGACATTTAGTATAAGAAGTGGTACGGAATTTATAAGGAATTTTAAACAGTAAAAATATACATGACAGTGATCTTC'

**18-SN vs HPV45\_L1ref**

**Primary Sequence**  
5'- CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA -3'

**Secondary Sequence**  
5'- GCCCAGGGCCATAACAATGGTATTTGTTGGCATAATCAGTTGTTTGTACTGTAGTGGACACTACCCGCAGTACTAATTTAACATTATGTGCCTC

**Maximum Delta G** -332.79 kcal/mole

---

**Delta G** -10.73 kcal/mole  
**Base Pairs** 8

5' CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA  
: : : : : : | | | | | | | |  
3' CTTTTATTGACATTTAGTATAAGGAGGTGTACAGATGATATGACGAATTTGAATCATCCAGTATACATGAACCGTGTCTCTAAAACACATCTCC

Figura 23. Evaluación “*in silico*” de la especificidad de la sonda 18-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV33\_L1ref, HPV35\_L1ref y HPV45\_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del OligoAnalyzer Versión 3.0. En cada esquema se muestra la secuencia de la sonda (Primary Sequence), la secuencia del DNA blanco viral complementario o no complementario (Secondary Sequence), los valores de Delta G que representan la fuerza de unión entre estas secuencias y finalmente se muestran los sitios donde se da el reconocimiento específico de las sondas por su secuencia complementaria en el DNA blanco viral, así como aquellos sitios que la sonda podría reconocer en otras secuencias virales no complementarias.

**18-SN vs HPV52\_L1ref**

```

ACTAACATGACTTTATGTGCTGAGGTTAAAAAGGAAAGCACATATAAAAAATGAAAAATTTTAAGGAATACCTTCGTCATGGCGAGGAATTGA

```

```

CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA

```

```

::: | | | | | :

```

```

LAGGAAAAATTGGAGTCGTGTATTTTCAGTACAATCACGATGCTCACCATAGGTGTTGACACTGTTTGTGACTAACGGGGTTGTATACGGTA

```

**18-SN vs HPV58\_L1ref**

```

ATTATGCACTGAAGTAACTAAGGAAGGTACATATAAAAAATGATAATTTTAAAGGAATATGTACGTCATGTTGAAGAATATGACTTACAGT

```

```

CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA

```

```

| | | | : : :

```

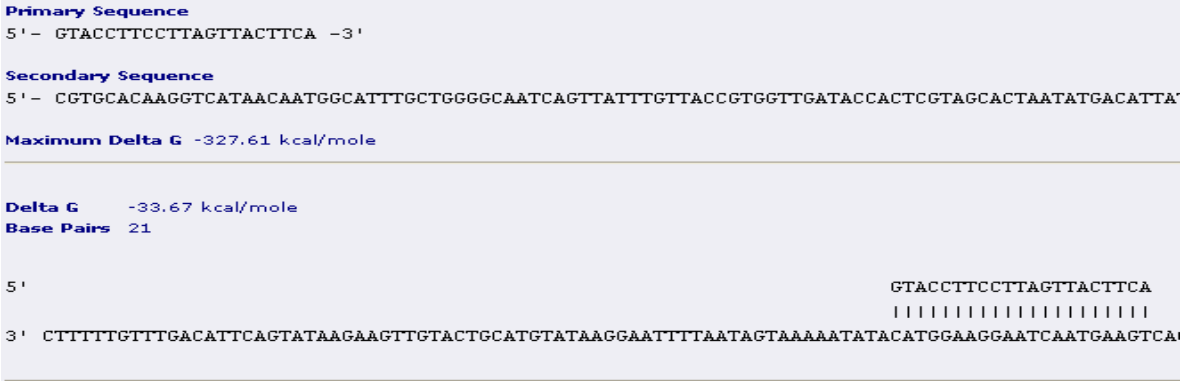
```

GTCACGTATTACAGTATAATCACGATGCTCACCATAGTTGGTGCCATTGTTTATTGACTAACGGGGTCGTTTACGGTAACAATACTGGA

```

Figura 24. Evaluación “*in silico*” de la especificidad de la sonda 18-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV52\_L1ref y HPV58\_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del OligoAnalyzer Versión 3.0. En cada esquema se muestra la secuencia de la sonda (Primary Sequence), la secuencia del DNA blanco viral complementario o no complementario (Secondary Sequence), los valores de Delta G que representan la fuerza de unión entre estas secuencias y finalmente se muestran los sitios donde se da el reconocimiento específico de las sondas por su secuencia complementaria en el DNA blanco viral, así como aquellos sitios que la sonda podría reconocer en otras secuencias virales no complementarias.

58-SN vs HPV58\_L1ref



58-SN vs HPV16\_L1ref



58-SN vs HPV18\_L1ref

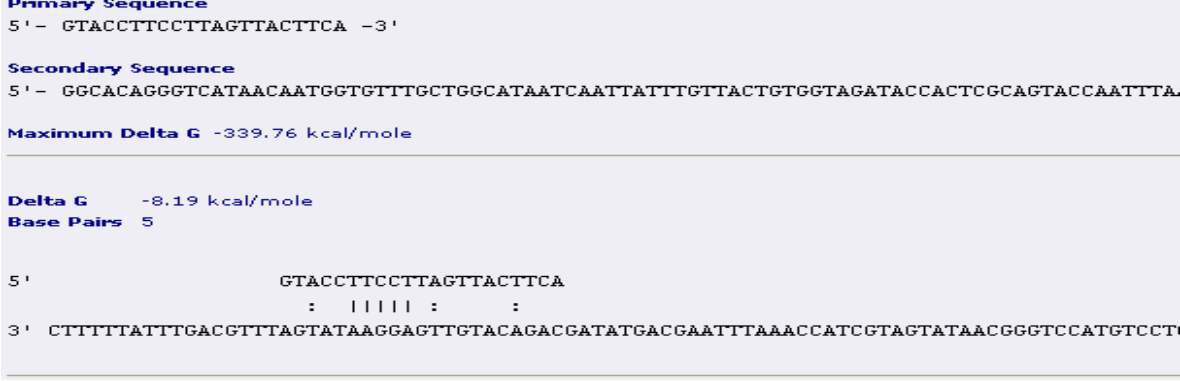


Figura 25. Evaluación “*in silico*” de la especificidad de la sonda 58-SN frente a su secuencia complementaria HPV58\_L1ref y otras secuencias virales no complementarias HPV16\_L1ref y HPV18\_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del OligoAnalyzer Versión 3.0. En cada esquema se muestra la secuencia de la sonda (Primary Sequence), la secuencia del DNA blanco viral complementario o no complementario (Secondary Sequence), los valores de Delta G que representan la fuerza de unión entre estas secuencias y finalmente se muestran los sitios donde se da el reconocimiento específico de las sondas por su secuencia complementaria en el DNA blanco viral, así como aquellos sitios que la sonda podría reconocer en otras secuencias virales no complementarias.

**58-SN vs HPV31\_L1ref**

<b>Primary Sequence</b>	
5'	GTACCTTCCTTAGTTACTTCA -3'
<b>Secondary Sequence</b>	
5'	GCTCAGGGACACAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGTTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACACGTAGTAC
<b>Maximum Delta G</b> -320.69 kcal/mole	
<b>Delta G</b> -8.19 kcal/mole	
<b>Base Pairs</b> 5	
5'	GTACCTTCCTTAGTTACTTCA
	:         :
3'	CTTTATATTTAACATTTAGTTTAAGGAGTGGTACAGAATTTATGAGAAAATTTAATGATGAAAATTTACATCATA

**58-SN vs HPV33\_L1ref**

<b>Primary Sequence</b>	
5'	GTACCTTCCTTAGTTACTTCA -3'
<b>Secondary Sequence</b>	
5'	GCACAAGGTCATAATAATGGTATTTGTTGGGGCAATCAGGTATTTGTTACTGTGGTAGATACCACTCGCAGTACTAATATGACTTTATG
<b>Maximum Delta G</b> -306.88 kcal/mole	
<b>Delta G</b> -11.69 kcal/mole	
<b>Base Pairs</b> 9	
5'	GTACCTTCCTTAGTTACTTCA
	::: ::
3'	CTTTTTGTTTGACATCTAGTATAAGAAGTTGTACAGAATATATAAGAAAATTTAAAAAGTAAAAATATACATGACAGTGATCAATGAACAC

**58-SN vs HPV35\_L1ref**

<b>Secondary Sequence</b>	
5'	GCACAAGGCCATAATAATGGTATTTGTTGGAGTAACCAATTGTTTGTACTGTAGTTGATACAACCCGTAGTACAAAATA
<b>Maximum Delta G</b> -317.4 kcal/mole	
<b>Delta G</b> -11.09 kcal/mole	
<b>Base Pairs</b> 7	
5'	GTACCTTCCTTAGTTACTTCA
	:           :::
3'	CTTTTATTTGACATTTAGTATAAGAAGTGGTACGGAATTTATAAGGAATTTAACAGTAAAAATATACATGACAGTGAT

Figura 26. Evaluación “*in silico*” de la especificidad de la sonda 58-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV31\_L1ref, HPV33\_L1ref y HPV35\_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del OligoAnalyzer Versión 3.0. En cada esquema se muestra la secuencia de la sonda (Primary Sequence), la secuencia del DNA blanco viral complementario o no complementario (Secondary Sequence), los valores de Delta G que representan la fuerza de unión entre estas secuencias y finalmente se muestran los sitios donde se da el reconocimiento específico de las sondas por su secuencia complementaria en el DNA blanco viral, así como aquellos sitios que la sonda podría reconocer en otras secuencias virales no complementarias.



**58-SN vs HPV45 L1ref****Primary Sequence**

5'- GTACCTTCCTTAGTTACTTCA -3'

**Secondary Sequence**

5'- GCCCAGGGCCATAACAATGGTATTTGTTGGCATAATCAGTTGTTTGTACTGTAGTGGACACTACCCGCAGTACTAATTTAA

**Maximum Delta G** -332.79 kcal/mole**Delta G** -8.19 kcal/mole**Base Pairs** 5

```

5'          GTACCTTCCTTAGTTACTTCA
           :  | | | |  :  :
3' CTTTTTATTTGACATTTAGTATAAGGAGGTGTACAGATGATATGACGAATTTGAATCATCCCAGTATACATGAACCGTGTCTT

```

**58-SN vs HPV52 \_L1ref****Primary Sequence**

5'- GTACCTTCCTTAGTTACTTCA -3'

**Secondary Sequence**

5'- GCGCAGGGCCACAATAATGGCATATGTTGGGGCAATCAGTTGTTTGTTCACAGTTGTGGATAACCACTCGTAGCACTAACATG

**Maximum Delta G** -340.89 kcal/mole**Delta G** -11.09 kcal/mole**Base Pairs** 7

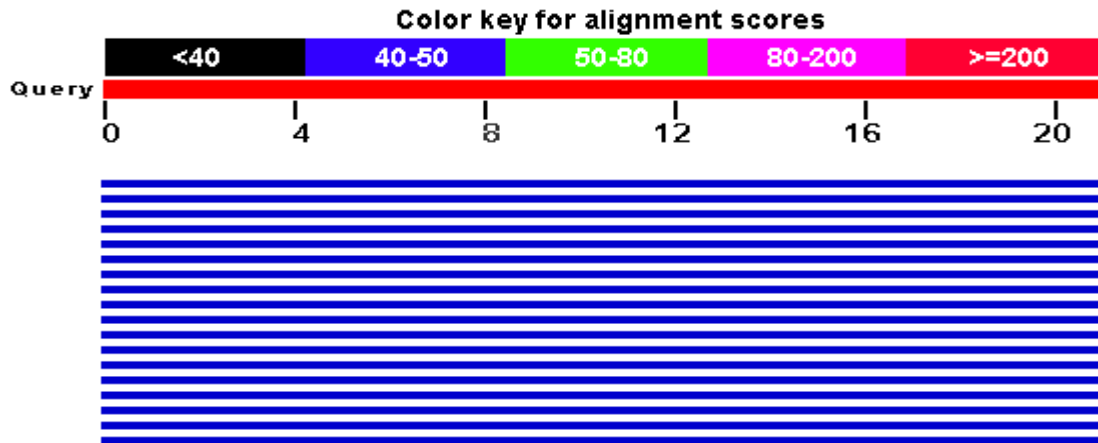
```

5'          GTACCTTCCTTAGTTACTTCA
           | | | | |  : : :
3' CTTTTTATTTAACATTTAGTTTAAAGGAGCGGTACTGCTTCCATAAGGAATTTTAAAAGTAAAAATATACACGAAAAGGAAAAA

```

Figura 27. Evaluación “*in silico*” de la especificidad de la sonda 58-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV45\_L1ref y HPV52\_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del OligoAnalyzer Versión 3.0. En cada esquema se muestra la secuencia de la sonda (Primary Sequence), la secuencia del DNA blanco viral complementario o no complementario (Secondary Sequence), los valores de Delta G que representan la fuerza de unión entre estas secuencias y finalmente se muestran los sitios donde se da el reconocimiento específico de las sondas por su secuencia complementaria en el DNA blanco viral, así como aquellos sitios que la sonda podría reconocer en otras secuencias virales no complementarias.

DQ469930 Human papillomavirus type 16 from Germany L1 gene, comp.. S=42 E=0.012



Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">EF133499.1</a>	Human papillomavirus type 16 isolate PT 209-03 L1 protein gene,	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">EF133498.1</a>	Human papillomavirus type 16 isolate PT 62-05 L1 protein gene,	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">EF133497.1</a>	Human papillomavirus type 16 isolate PT 59-05 L1 protein gene,	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ469930.1</a>	Human papillomavirus type 16 from Germany L1 gene, complete cds	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ422774.1</a>	Human papillomavirus type 16 clone 17 L1 protein (L1) gene, partial	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ422772.1</a>	Human papillomavirus type 16 clone 60 L1 protein (L1) gene, partial	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ422771.1</a>	Human papillomavirus type 16 clone 61 L1 protein (L1) gene, partial	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ422770.1</a>	Human papillomavirus type 16 clone 67 L1 protein (L1) gene, partial	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ422769.1</a>	Human papillomavirus type 16 clone 69 L1 protein (L1) gene, partial	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ422768.1</a>	Human papillomavirus type 16 clone 7 L1 protein (L1) gene, partial	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%

> [gb|DQ469930.1](#) Human papillomavirus type 16 from Germany L1 gene, complete cds  
Length=1518

Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.012  
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)  
Strand=Plus/Minus

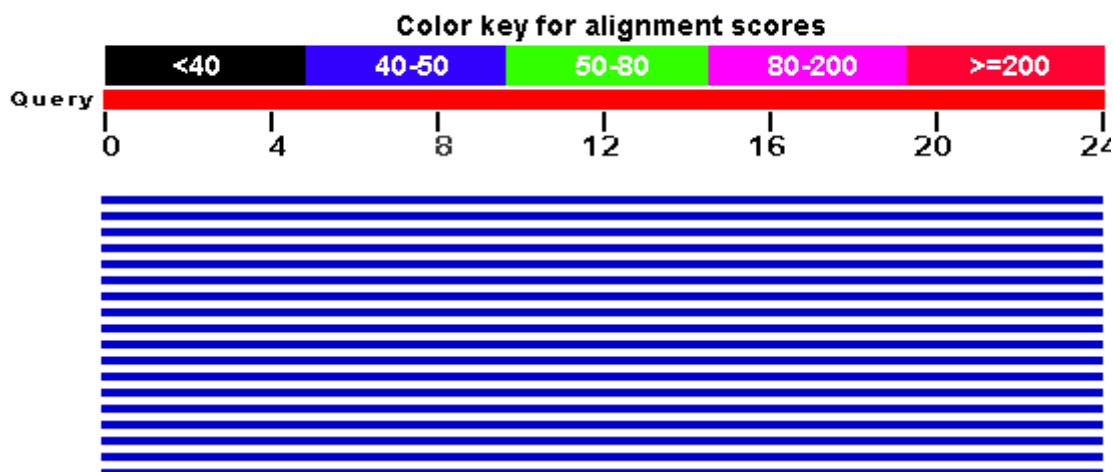
```
Query 1      GTTCTGAAGTAGATATGGCA 21
           |||
Sbjct 1058  GTTCTGAAGTAGATATGGCA 1038
```

Figura 28. Reconocimiento específico de la sonda 16-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 16 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). La primer imagen representa las zonas en las que se encontraron secuencias similares a la sonda 16-SN en otros microorganismos presentes en la base de datos. A continuación aparecen las secuencias de estos microorganismos ordenadas de mayor a menor similitud. Al final muestra el total de bases que fueron reconocidas en la base de datos.

Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">EF140830.1</a>	Human papillomavirus type 18 isolate N16 major capsid protein L1	<a href="#">48.1</a>	48.1	100%
<a href="#">EF140829.1</a>	Human papillomavirus type 18 isolate N15 major capsid protein L1	<a href="#">48.1</a>	48.1	100%
<a href="#">EF140828.1</a>	Human papillomavirus type 18 isolate N14 major capsid protein L1	<a href="#">48.1</a>	48.1	100%
<a href="#">EF140827.1</a>	Human papillomavirus type 18 isolate N13 major capsid protein L1	<a href="#">48.1</a>	48.1	100%
<a href="#">EF140826.1</a>	Human papillomavirus type 18 isolate CC major capsid protein L1	<a href="#">48.1</a>	48.1	100%
<a href="#">EF140825.1</a>	Human papillomavirus type 18 isolate BB major capsid protein L1	<a href="#">48.1</a>	48.1	100%
<a href="#">EF140824.1</a>	Human papillomavirus type 18 isolate AA major capsid protein L1	<a href="#">48.1</a>	48.1	100%
<a href="#">EF140823.1</a>	Human papillomavirus type 18 isolate N9 major capsid protein L1	<a href="#">48.1</a>	48.1	100%
<a href="#">EF140822.1</a>	Human papillomavirus type 18 isolate N8 major capsid protein L1	<a href="#">48.1</a>	48.1	100%
<a href="#">EF140821.1</a>	Human papillomavirus type 18 isolate R major capsid protein L1	<a href="#">48.1</a>	48.1	100%

EF140826 Human papillomavirus type 18 isolate CC major capsid pr.. S=48 E=0.00033

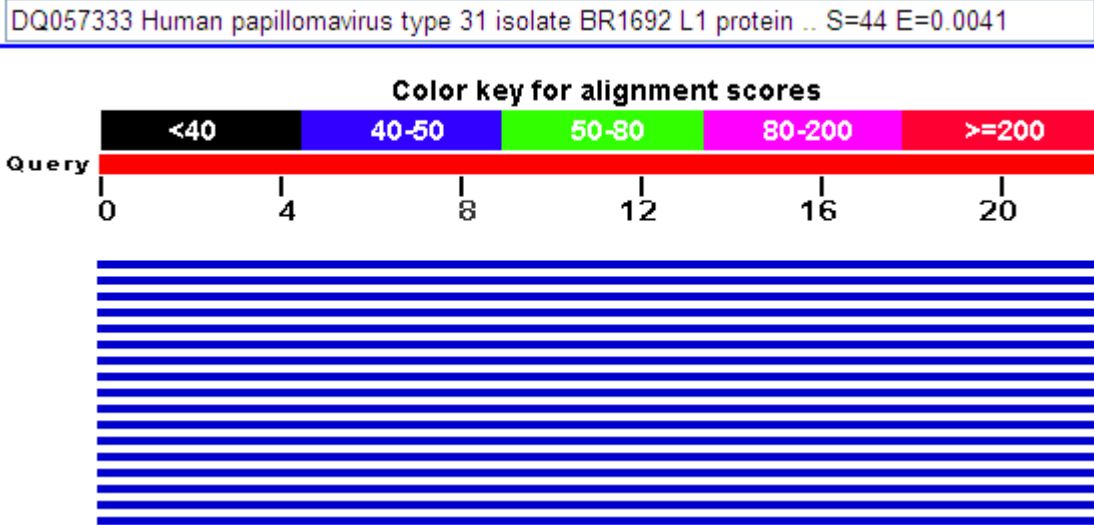


```
> gb|EF140826.1 Human papillomavirus type 18 isolate CC major capsid protein
L1 gene, partial cds
Length=146
```

```
Score = 48.1 bits (24), Expect = 3e-04
Identities = 24/24 (100%), Gaps = 0/24 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1 CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA 24
      |||
Sbjct 74 CCAGGTACAGGAGACTGTGTAGAA 51
```

Figura 29. Reconocimiento específico de la sonda 18-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 18 según la base de datos del BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool). La primer imagen representa las zonas en las que se encontraron secuencias similares a la sonda 18-SN en otros microorganismos presentes en la base de datos. A continuación aparecen las secuencias de estos microorganismos ordenadas de mayor a menor similitud. Al final muestra el total de bases que fueron reconocidas en la base de datos.



Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">DQ057333.1</a>	Human papillomavirus type 31 isolate BR1692 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">DQ057332.1</a>	Human papillomavirus type 31 isolate MR9917 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">DQ057331.1</a>	Human papillomavirus type 31 isolate TL2069 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">DQ057330.1</a>	Human papillomavirus type 31 isolate BR1213 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">DQ057329.1</a>	Human papillomavirus type 31 isolate HK31C L1 protein (L1) gene,	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">DQ057328.1</a>	Human papillomavirus type 31 isolate HK31B L1 protein (L1) gene,	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">DQ057327.1</a>	Human papillomavirus type 31 isolate HK31A L1 protein (L1) gene,	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">DQ218249.1</a>	Human papillomavirus type 31 isolate PVPOA13 major capsid protein	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%

```
> gb|DQ057333.1 Human papillomavirus type 31 isolate BR1692 L1 protein (L1) gene,
partial cds
Length=351
```

```
Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.004
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1  GTATCACTGTTTGCAATTGCAG 22
          |||
Sbjct 63  GTATCACTGTTTGCAATTGCAG 42
```

Figura 30. Reconocimiento específico de la sonda 31-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 31 según la base de datos del BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool). La primer imagen representa las zonas en las que se encontraron secuencias similares a la sonda 31-SN en otros microorganismos presentes en la base de datos. A continuación aparecen las secuencias de estos microorganismos ordenadas de mayor a menor similitud. Al final muestra el total de bases que fueron reconocidas en la base de datos.

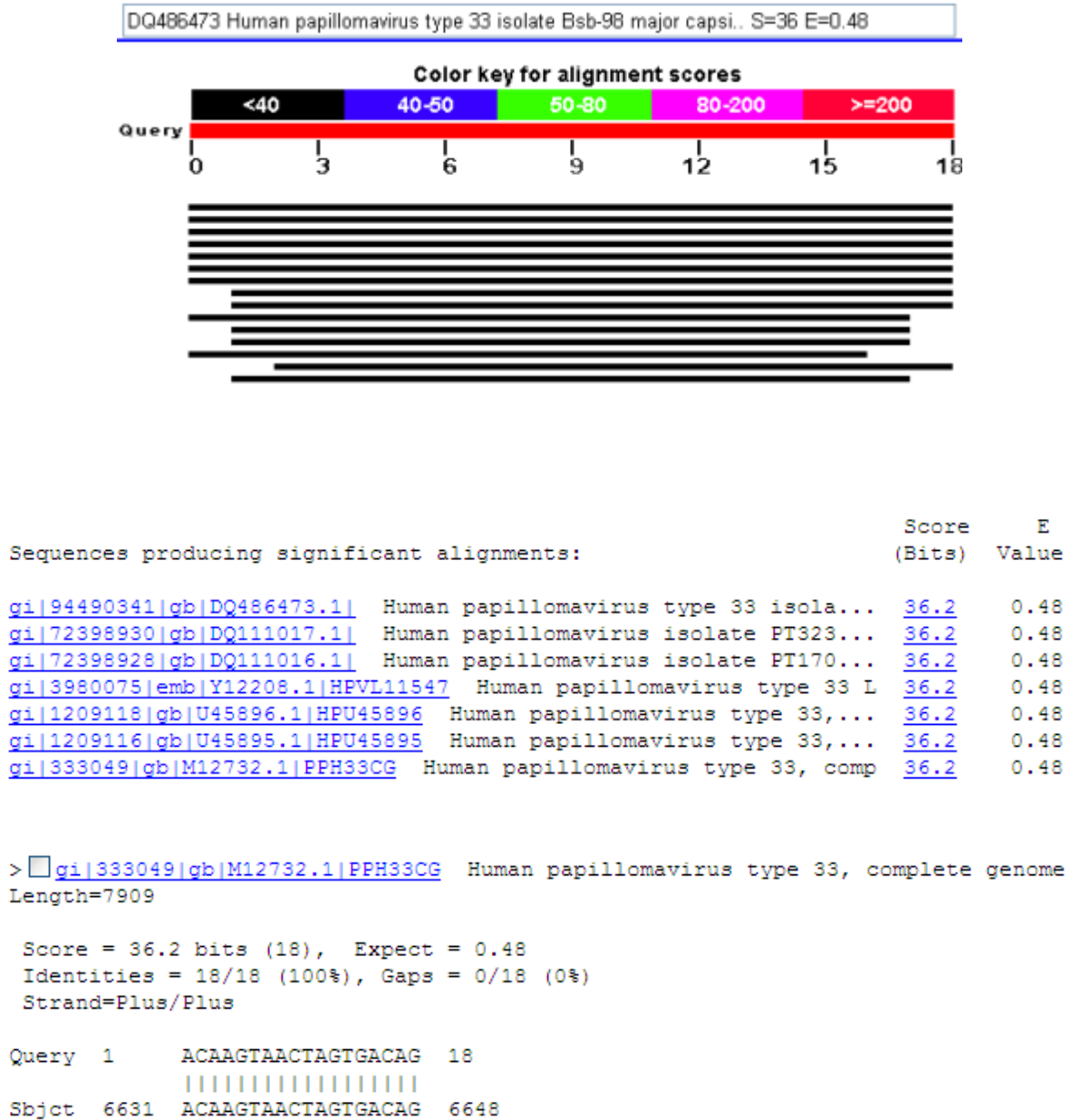
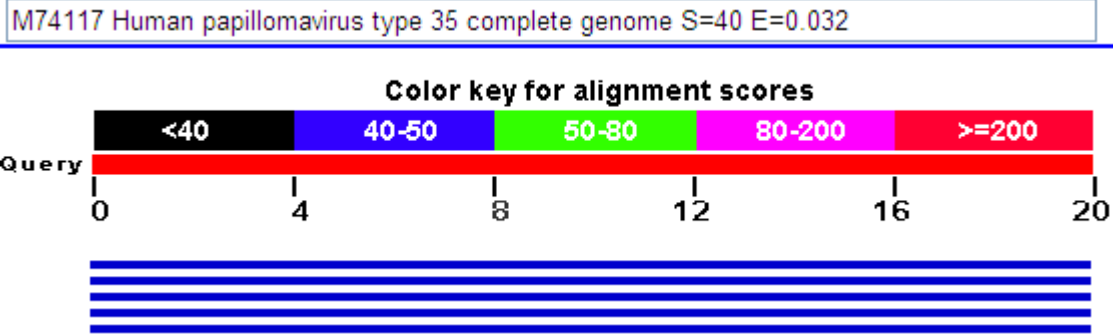


Figura 31. Reconocimiento específico de la sonda 33-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 33 según la base de datos del BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool). La primer imagen representa las zonas en las que se encontraron secuencias similares a la sonda 33-SN en otros microorganismos presentes en la base de datos. A continuación aparecen las secuencias de estos microorganismos ordenadas de mayor a menor similitud. Al final muestra el total de bases que fueron reconocidas en la base de datos.



Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

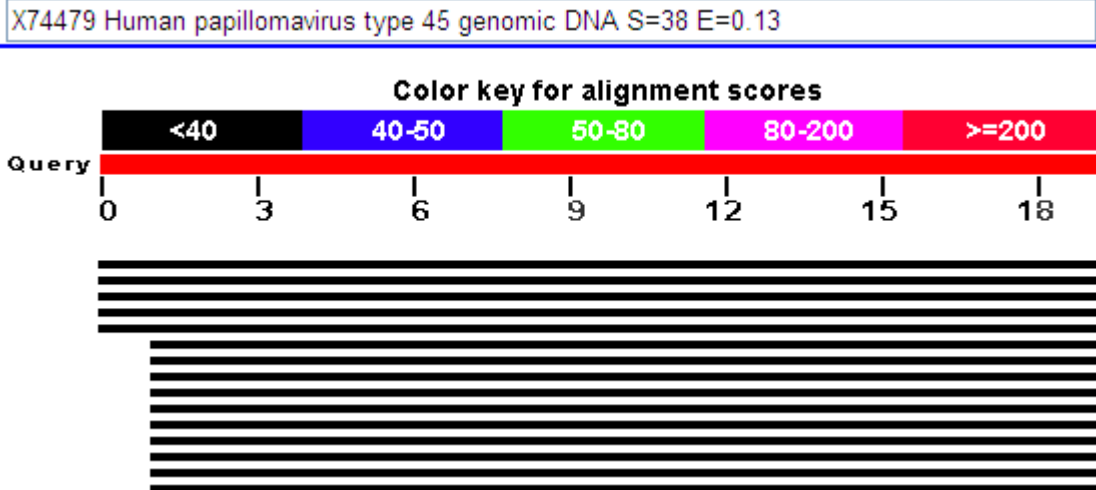
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">DQ057339.1</a>	Human papillomavirus type 35 isolate SA1505 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%
<a href="#">DQ057338.1</a>	Human papillomavirus type 35 isolate TW4232 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%
<a href="#">M74117.1</a>	Human papillomavirus type 35 complete genome	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%
<a href="#">S40240.1</a>	L1 [human papillomavirus HPV, mucosotropic type 35, cervical	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%
<a href="#">X74477.1</a>	Human papillomavirus type 35H genomic DNA	<a href="#">40.1</a>	40.1	100%

```
> gb|M74117.1|PPH35CG Human papillomavirus type 35 complete genome
Length=7851
```

```
Score = 40.1 bits (20), Expect = 0.032
Identities = 20/20 (100%), Gaps = 0/20 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1 CTGTCACTAGAAGACACAGC 20
      |||
Sbjct 6634 CTGTCACTAGAAGACACAGC 6615
```

Figura 32. Reconocimiento específico de la sonda 35-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 35 según la base de datos del BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool). La primer imagen representa las zonas en las que se encontraron secuencias similares a la sonda 35-SN en otros microorganismos presentes en la base de datos. A continuación aparecen las secuencias de estos microorganismos ordenadas de mayor a menor similitud. Al final muestra el total de bases que fueron reconocidas en la base de datos.



**Sequences producing significant alignments:**

(Click headers to sort columns)

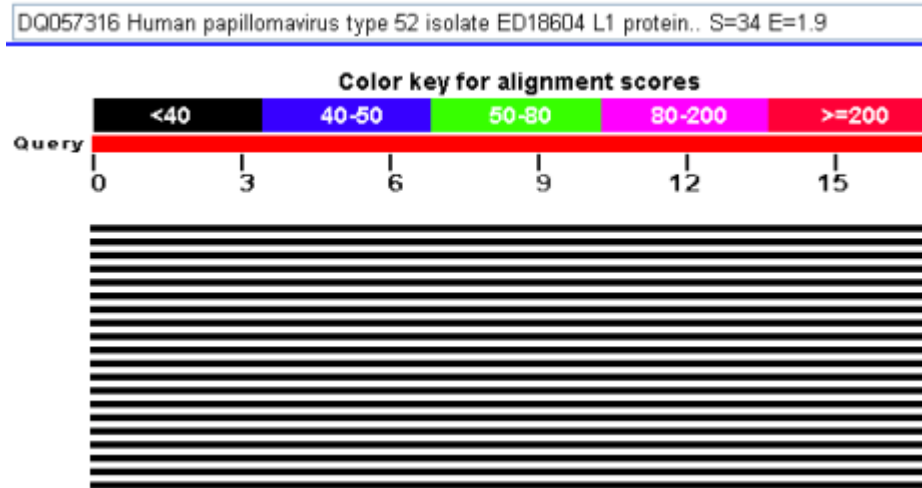
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">DQ080002.1</a>	Human papillomavirus type 45 L2 (L2) and L1 (L1) genes, complete	<a href="#">38.2</a>	38.2	100%
<a href="#">S40261.1</a>	L1 [human papillomavirus HPV, mucosotropic type 45, cervical	<a href="#">38.2</a>	38.2	100%
<a href="#">X74479.1</a>	Human papillomavirus type 45 genomic DNA	<a href="#">38.2</a>	38.2	100%
<a href="#">U45906.1</a>	Human papillomavirus type 45, isolate IS816, major capsid protein	<a href="#">38.2</a>	38.2	100%
<a href="#">U45909.1</a>	Human papillomavirus type 45, isolate IS252, major capsid protein	<a href="#">36.2</a>	36.2	94%
<a href="#">U45908.1</a>	Human papillomavirus type 45, isolate IS282, major capsid protein	<a href="#">36.2</a>	36.2	94%
<a href="#">U45907.1</a>	Human papillomavirus type 45, isolate IS040, major capsid protein	<a href="#">36.2</a>	36.2	94%

```
> emb|X74479.1|HPV45 Human papillomavirus type 45 genomic DNA
Length=7858
```

```
Score = 38.2 bits (19), Expect = 0.13
Identities = 19/19 (100%), Gaps = 0/19 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1 CTTGGCACAGGATTTTGTG 19
        |||
Sbjct 6677 CTTGGCACAGGATTTTGTG 6659
```

Figura 33. Reconocimiento específico de la sonda 45-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 45 según la base de datos del BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool). La primer imagen representa las zonas en las que se encontraron secuencias similares a la sonda 45-SN en otros microorganismos presentes en la base de datos. A continuación aparecen las secuencias de estos microorganismos ordenadas de mayor a menor similitud. Al final muestra el total de bases que fueron reconocidas en la base de datos.



Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">DQ057316.1</a>	Human papillomavirus type 52 isolate ED18604 L1 protein (L1)	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">DQ057315.1</a>	Human papillomavirus type 52 isolate ED123 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">DQ111015.1</a>	Human papillomavirus isolate PT123-04 L1 protein gene, partial cds	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">S40277.1</a>	L1 [human papillomavirus HPV, type Xa, cervical carcinoma in situ,	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">X74481.1</a>	Human papillomavirus type 52 genomic DNA	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">U45921.1</a>	Human papillomavirus type 52, isolate IS1001, major capsid protein	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">U45920.1</a>	Human papillomavirus type 52, isolate IS370, major capsid protein	<a href="#">44.1</a>	44.1	100%
<a href="#">DQ057319.1</a>	Human papillomavirus type 52 isolate HK2571 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">36.2</a>	36.2	100%
<a href="#">DQ057318.1</a>	Human papillomavirus type 52 isolate HK1243 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">36.2</a>	36.2	100%
<a href="#">DQ057317.1</a>	Human papillomavirus type 52 isolate HK1151 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">36.2</a>	36.2	100%
<a href="#">U45922.1</a>	Human papillomavirus type 52, isolate IS1015, major capsid protein	<a href="#">36.2</a>	36.2	100%
<a href="#">U45919.1</a>	Human papillomavirus type 52, isolate IS121, major capsid protein	<a href="#">36.2</a>	36.2	100%
<a href="#">U45918.1</a>	Human papillomavirus type 52, isolate IS705, major capsid protein	<a href="#">36.2</a>	36.2	100%

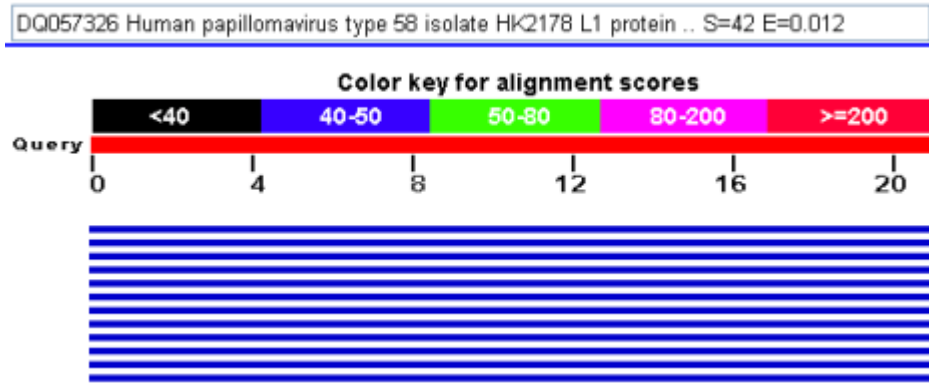
> [emb|X74481.1|HPV52](#) Human papillomavirus type 52 genomic DNA  
Length=7942

Score = 44.1 bits (22), Expect = 0.004  
Identities = 22/22 (100%), Gaps = 0/22 (0%)  
Strand=Plus/Minus

```
Query 1      CTTTCCTTTTAAACCTCAGCAC 22
            |||
Sbjct 6712  CTTTCCTTTTAAACCTCAGCAC 6691
```

Figura 34. Reconocimiento específico de la sonda 52-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 52 según la base de datos del BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool). La primer imagen representa las zonas en las que se encontraron secuencias similares a la sonda 52-SN en otros microorganismos presentes en la base de datos. A continuación aparecen las secuencias de estos microorganismos ordenadas de mayor a menor similitud. Al final muestra el total de bases que fueron reconocidas en la base de datos.





Sequences producing significant alignments:  
(Click headers to sort columns)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage
<a href="#">DQ057326.1</a>	Human papillomavirus type 58 isolate HK2178 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ057325.1</a>	Human papillomavirus type 58 isolate ED1813 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ057324.1</a>	Human papillomavirus type 58 isolate ED6197 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ057323.1</a>	Human papillomavirus type 58 isolate ED1710 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ057322.1</a>	Human papillomavirus type 58 isolate ED1767 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">DQ057321.1</a>	Human papillomavirus type 58 isolate OK332 L1 protein (L1) gene,	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">U45928.1</a>	Human papillomavirus type 58, isolate IS404, major capsid protein L1	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">U45927.1</a>	Human papillomavirus type 58, isolate IS131, major capsid protein L1	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">U45926.1</a>	Human papillomavirus type 58, isolate IS1021, major capsid protein	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">U45925.1</a>	Human papillomavirus type 58, isolate IS573, major capsid protein L1	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">U45924.1</a>	Human papillomavirus type 58, isolate IS068, major capsid protein L1	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%
<a href="#">D90400.1</a>	Human papillomavirus type 58 complete genome	<a href="#">42.1</a>	42.1	100%

```
> dbj|D90400.1|PPH58 Human papillomavirus type 58 complete genome
Length=7824
```

```
Score = 42.1 bits (21), Expect = 0.012
Identities = 21/21 (100%), Gaps = 0/21 (0%)
Strand=Plus/Minus
```

```
Query 1      GTACCTTCCTTAGTTACTTCA  21
            |||
Sbjct  6700    GTACCTTCCTTAGTTACTTCA  6680
```

Figura 35. Reconocimiento específico de la sonda 58-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 58 según la base de datos del BLAST (**B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool). La primer imagen representa las zonas en las que se encontraron secuencias similares a la sonda 58-SN en otros microorganismos presentes en la base de datos. A continuación aparecen las secuencias de estos microorganismos ordenadas de mayor a menor similitud. Al final muestra el total de bases que fueron reconocidas en la base de datos.

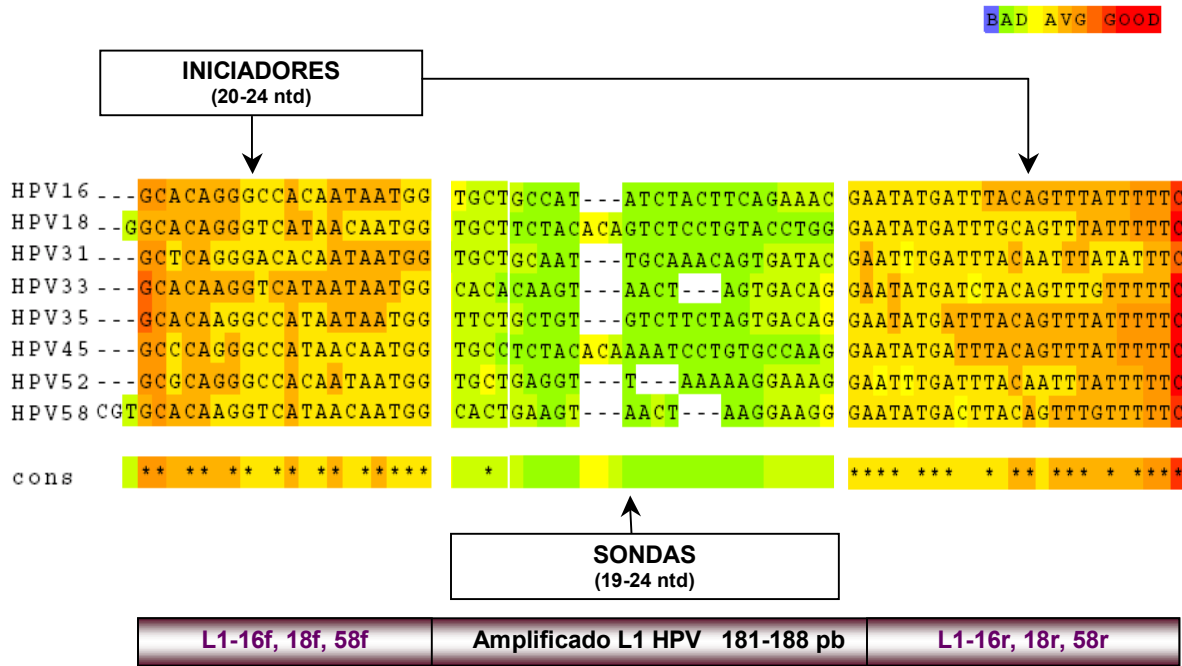


Figura 36. Diseño general del Biochip de DNA para la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC. El diseño comprende la detección y tipificación viral a partir de pequeñas sondas (19 y 24 bases) con la variabilidad suficiente para identificar de manera específica a cada uno de los VPH de alto riesgo de interés mediante el reconocimiento de un fragmento en el gen L1 previamente amplificado por PCR de entre 181 y 188 pb.

#### **8.1.1.4.2 Selección del DNA blanco sintético.**

Una vez que las sondas de detección molecular de VPH de alto riesgo fueron seleccionadas, la estandarización del Biochip de DNA requirió el uso de secuencias de DNA de origen sintético que simularon la secuencia viral de interés. El uso de este tipo de secuencias fue propuesto para evaluar la especificidad que mostraron las sondas seleccionadas en las evaluaciones de hibridación virtual, pero esta vez en verdaderos ensayos de hibridación sobre los Biochips de DNA.

Como la validación del Biochip de DNA sería realizada en base a la detección y tipificación específica de los VPH 16, 18 y 58, decidimos usar la secuencia de referencia de estos tres tipos virales como DNA blanco durante los procesos de estandarización. Cada una de estos oligonucleótidos de entre 184 y 188 bases denominados DNABs-L1/16, DNABs-L1/18 y DNABs-L1/58 simuló el fragmento de amplificación que sería obtenido a partir de los VPH 16, 18 y 58 durante el proceso de validación del Biochip de DNA. Estas secuencias resultaron fundamentales para determinar una vez más la especificidad de las sondas por su DNA blanco viral (VPH 16, 18 o 58) y para detectar con anticipación posibles hibridaciones inespecíficas entre las secuencias analizadas (Ver Tabla 10 y Figuras 15 y 37).

#### **8.1.1.4.3 Selección de los oligonucleótidos estabilizadores.**

En este trabajo, garantizar la especificidad en el reconocimiento de las sondas por su secuencia complementaria en el DNA blanco e incrementar el potencial de detección viral sobre los Biochips de DNA fueron dos de las prioridades principales. Para lograr esto una nueva estrategia en la detección viral que favorece el reconocimiento específico entre secuencias virales fue propuesta. Esta estrategia incluyó el alineamiento de un pequeño oligonucleótido a la secuencia de DNA blanco viral en la región contigua del sitio de reconocimiento de la sonda durante los procesos de hibridación, este oligonucleótido es conocido como oligonucleótido estabilizador. El uso de estas secuencias ha demostrado incrementar la estabilidad de la secuencia del DNA blanco viral favoreciendo la identificación específica de la sonda por su secuencia complementaria, además de facilitar la detección de la hibridación sobre los Biochips de DNA (Ver Figura 16) [76, 77, 88-93].

Como la validación del Biochip de DNA dirigido al diagnóstico molecular de VPH de alto riesgo sería realizada en base a los VPH 16, 18 y 58, tres oligonucleótidos estabilizadores de 62 bases denominados ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58 fueron propuestos para incrementar la especificidad de nuestro sistema y favorecer la detección de la hibridación sobre los Biochips de DNA. Estos oligonucleótidos estabilizadores fueron diseñados para reconocer específicamente dos regiones, la primera corresponde a una región contigua al sitio de reconocimiento de la sonda, tanto en el DNA blanco sintético (DNABs-L1/16, DNABs-L1/18, DNABs-L1/58), como en los productos de amplificación de los VPH 16, 18 y 58 presentes en muestras clínicas con CC (PCR1), la segunda es

complementaria a una secuencia reportera marcada con Cy3 (REP/UNI-Cy3) quien finalmente nos permitió detectar las hibridaciones sobre la superficie de los Biochips de DNA. Al igual que las sondas, la eficiencia de cada oligonucleótido estabilizador (ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58) por el reconocimiento específico de su secuencia complementaria en el DNA blanco viral (sintético - DNABs-L1/16, DNABs-L1/18, DNABs-L1/58- y tumoral -PCR-1) y al REP/UNI-Cy3 también fue valorada en el programa Oligo Analyzer Versión 3.0 (Ver Tabla 11 y Figuras 16 y 37).

### **8.1.2 Estandarización del Biochip de DNA.**

La estandarización del Biochip de DNA dirigido a la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC, se llevo a cabo a partir del uso de secuencias de DNA de origen sintético que simulaban la secuencia de referencia de los VPH 16, 18 y 58 quienes inicialmente fueron utilizados para validar la funcionalidad de nuestro sistema de acuerdo a nuestra disponibilidad de muestras biológicas. A cada una de estas secuencias le fue asignada una función específica, algunas fueron usadas como sondas (16-SN, 18-SN, 58-SN), otras como DNA blanco viral (DNABs-L1/16, DNABs-L1/18, DNABs-L1/58), como oligonucleótidos estabilizadores (ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58) o bien, como reportero universal marcado (REP/UNI-Cy3) (Ver Tablas 9 a 11).

Una vez disponibles cada una de estas secuencias, el primer paso en la estandarización de nuestro sistema fue fabricar los Biochip de DNA donde se llevaría a cabo la detección y tipificación de los VPH 16, 18 y 58 mediante técnicas de hibridación múltiple. Para ello, cada una de las sondas de identificación viral (16-SN, 18-SN, 58-SN), incluyendo un control positivo y otro negativo ( $\beta$ -Gson y RET) fueron depositadas con un patrón previamente definido sobre portaobjetos convencionales. Estos dispositivos representaron los Biochips de DNA donde se realizó la identificación viral durante los procesos de hibridación (Ver Tabla 9 y Figura 11).

Una vez que contamos con los Biochips de DNA lo primero que hicimos fue establecer un control interno de hibridación que nos permitiera evaluar la calidad de la hibridación. Este control interno nos permitió saber por un lado que las condiciones de hibridación fueron adecuadas y suficientes para que el reconocimiento e hibridación entre las secuencias involucradas se realizara, así como para confirmar con mayor certeza la presencia de secuencias virales de alto riesgo sobre la superficie del Biochip de DNA.



En este caso nosotros usamos como control interno de hibridación el producto de amplificación del gen de la  $\beta$ -Globina cuyos iniciadores fueron previamente marcados con Cy3. Diferentes concentraciones del producto de amplificación del gen de la  $\beta$ -Globina fueron sometidas a hibridación sobre la superficie de los Biochips de DNA con rangos que fueron desde los 2.5 pmol/ $\mu$ L hasta los 200 pmol/ $\mu$ L.

En la mayoría de los estudios, las hibridaciones sobre Chips de DNA se realizan en soluciones salinas como SSC (citrate saline solution – SSC 3X, SSC 4X) y SSPE (saline sodium phosphate-EDTA buffer – SSPE 3X, SSPE 6X) [58-66]. Algunos otros chips como los sistemas genesensor proponen el uso de TMAC (tetramethylammonium chloride – TMAC 3.3 M y TMAC 5M) para favorecer los procesos de hibridación [88-93]. Básicamente, el SSC y el SSPE representan dos de las soluciones más utilizadas en procesos de hibridación donde la detección es fluorescente, mientras que el TMAC ha sido usado en sistemas donde la detección de las señales de hibridación aún es radiactiva. En este caso, nosotros decidimos evaluar nuestro Biochip de DNA dirigido a la detección de VPH de alto riesgo en presencia de dos soluciones de hibridación, la primera en SSC 3X por ser una de las más utilizadas sobre los Chips de DNA y la segunda, en TMAC por favorecer la hibridación entre las secuencias de DNA (Ver Tabla 15). En este caso las hibridaciones se realizaron en una solución de hibridación con SSC, a temperatura ambiente y en ausencia de secuencias de DNA viral (Ver Figura 38).

De acuerdo con los patrones de hibridación obtenidos sobre la superficie del Biochip de DNA, la hibridación de las secuencias del gen de la  $\beta$ -globina resulto ser muy específica y muy sensible. No se registraron hibridaciones inespecíficas aparentes y la intensidad de la señal pudo ser visualizada aún en concentraciones mínimas del producto de amplificación del gen de la  $\beta$ -Globina bajo condiciones de hibridación simples. Estos resultados sugieren que este tipo de secuencias pueden ser usadas como un buen control de calidad durante los procesos de hibridación ya que la unión entre sus secuencias fue posible aún bajo mínimas condiciones de hibridación (a temperatura ambiente, en presencia de la solución salina SSC 3X / SDS 0.1 %). Como en estos ensayos fue posible registrar señales de hibridación adecuadas, no fue necesario realizar grandes modificaciones a las condiciones de hibridación que posteriormente se realizaron sobre los Biochips de DNA.

Una vez establecidas las condiciones mínimas de hibridación para que ocurriera el reconocimiento entre las secuencias de DNA viral sobre los Biochips de DNA, se procedió a evaluar la funcionalidad del diseño previamente establecido.

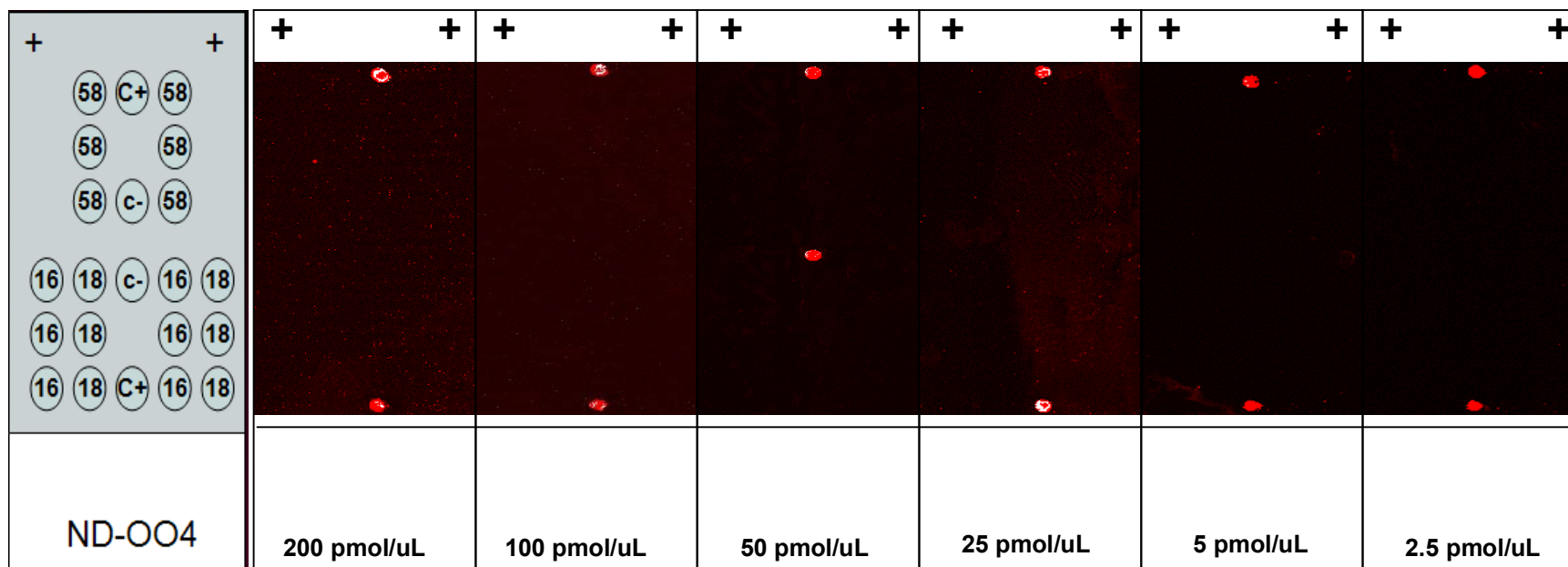


Figura 38. Hibridación del producto de amplificación del gen de la  $\beta$ -Globina sobre los Biochips de DNA. Diferentes concentraciones del producto de amplificación del gen de la  $\beta$ -Globina marcados con Cy3 fueron sometidos a hibridación sobre los Biochips de DNA en presencia de una solución de hibridación con SSC, a temperatura ambiente y en ausencia de secuencia de DNA viral. El reconocimiento e hibridación específica entre estas secuencias fue usado como control interno de hibridación durante la detección y tipificación de los VPH de alto riesgo tanto en la estandarización, como en la validación de los Biochips de DNA.

### **8.1.2.1 Detección de secuencias de DNA blanco de los VPH 16, 18 y 58 sobre los Biochips de DNA a partir del uso oligonucleótidos virales específicos.**

Para evaluar la eficiencia de las sondas propuestas para la detección y tipificación viral, se recurrió al uso de oligonucleótidos que simulaban la secuencia de interés en los VPH 16, 18 y 58 (DNA blanco viral) durante los procesos de hibridación. El uso de este tipo de secuencias durante el diseño y evaluación de herramientas diagnósticas pueden representar un excelente patrón de referencia para determinar con mayor certeza la afinidad y la especificidad de las sondas por su secuencia complementaria en un DNA blanco con características similares a la secuencia viral de interés. De esta manera será más fácil identificar de manera anticipada aquellas sondas que en condiciones de hibridación real sobre los Biochips de DNA puedan presentar poca o nula afinidad por su secuencia complementaria o bien, que su especificidad sea tan baja que no garantice una identificación viral precisa.

En ensayos de hibridación preliminares, cada una de estos oligonucleótidos fue sometido a hibridación sobre los Biochips de DNA, es decir, el DNABs-L1/16 fue sometido a hibridación simultánea con su respectivo ONEST/16, el DNABs-L1/18 con el ONEST/18 y el DNABs-L1/58 con el ONEST/58, todos en presencia del REP/UNI-Cy3. También se realizaron ensayos donde todas estas secuencias fueron mezcladas y sometidas a hibridación simultánea sobre los Biochips de DNA.

Como este trabajo propone un sistema de detección y tipificación viral relativamente nuevo, diferentes concentraciones de los DNA blanco DNABs-L1/16, DNABs-L1/18, DNABs-L1/58, de los oligonucleótidos estabilizadores ONEST/16, ONEST/18, ONEST/58 y del reportero universal REP/UNI-Cy3 fueron inicialmente evaluadas (12.5 pmol hasta 200 pmol) (Ver Tabla 15). En cuanto a la temperatura y el tiempo de hibridación, la mayoría de los trabajos manejan solo una temperatura que por lo general es 40 °C durante periodos de hibridación de 2 a 3 horas, sin embargo en este trabajo se evaluó la eficiencia del Biochip de DNA bajo tres diferentes temperaturas: 25, 37 y 45 °C y durante periodos de hibridación de 4, 8 y 24 horas.

Para optimizar el reconocimiento y unión específico entre las secuencias virales analizadas sobre los Biochips de DNA se realizaron modificaciones a las soluciones y temperaturas de hibridación, a las soluciones de lavado, a los tiempos y formas de lavado, así como a la concentración de las sondas, del DNA blanco (DNABs-L1/16, DNABs-L1/18, DNABs-L1/58) o tumoral (PCR-1), de los oligonucleótidos estabilizadores (ONEST/16, ONEST/18, ONEST/58) y de las secuencias reporteras (REP/UNI-Cy3), aspectos que pueden influir en la detección de las señales de hibridación viral sobre los Biochip de DNA (Ver Tabla 15).



De acuerdo con nuestros resultados preliminares, las señales de hibridación entre los DNA blanco DNABs-L1/16, DNABs-L1/18, DNABs-L1/58 y las sondas inmovilizadas sobre los Biochips de DNA (16-SN, 18-SN, 58-SN) solo fueron detectadas en presencia de SSC 3X, mientras que en presencia de TMAC 5M ninguna señal pudo ser observada. En presencia de SSC 3X fue posible eliminar con mucha mayor facilidad el exceso de sales, secuencias de DNA y fluorescencia sobre la superficie del Biochip de DNA, mientras que en presencia de TMAC 5M, eliminarlos requirió de un mayor esfuerzo, siendo imposible en la mayoría de los casos.

Una de las causas por las que quizá no se detectaron señales de hibridación sobre la superficie del Biochip de DNA en presencia de TMAC 5M, pueden ser los lavados exhaustivos realizados para eliminar el exceso de fluorescencia que impedía visualizar la presencia de señales de hibridación sobre la superficie de los Biochips de DNA. Sin embargo, como se realizaron ensayos de hibridación adicionales donde se evaluaron concentraciones mínimas de fluorescencia (hasta 12.5 pmol del REP/UNI-Cy3) bajo condiciones de lavado normales y tampoco se detectó la presencia de señales de hibridación entre estas secuencias virales, se concluyó que el uso de TMAC 5M impedía la adecuada interpretación de los resultados, por lo que su uso fue interrumpido (datos no mostrados).

La hibridación por separado de cada uno de los DNA blanco (DNABs-L1/16, DNABs-L1/18, DNABs-L1/58) en presencia de su correspondiente oligonucleótido estabilizador (ONEST/16, ONEST/18, ONEST/58) y el REP/UNI-Cy3 sobre los Biochips de DNA, registró una alta especificidad de las sondas por su secuencia complementaria (Ver Figuras 39 a 42). Así, después de someter a hibridación el DNABs-L1/16 sobre los Biochips de DNA, en presencia del ONEST/16 y el REP/UNI-Cy3, se registraron señales de hibridación únicamente en los sitios de inmovilización de las sondas 16-SN, sin la presencia aparente de hibridaciones con las demás sondas presentes en el Biochip de DNA. Estos resultados indican una alta especificidad de las sondas 16-SN por su secuencia complementaria en el DNA blanco sintético (Ver Figura 39). Resultados similares fueron obtenidos durante la hibridación del DNABs-L1/18 con su ONEST/18 y el REP/UNI-Cy3 donde se detectaron señales de hibridación solo en aquellos sitios donde la sonda 18-SN fue inmovilizada, o como en el caso del DNABs-L1/58 con su ONEST/58 y el REP/UNI-Cy3 cuyas señales de hibridación fueron registradas únicamente en los sitios de inmovilización de las sondas 58-SN (Ver Figuras 40 y 41).

Es importante resaltar que no se registraron cambios significativos en la intensidad de las señales de hibridación a lo largo de las diferentes concentraciones del DNA blanco sintético que fueron evaluadas, aunque por lo general siempre se maneja un exceso tanto de los oligonucleótidos estabilizadores ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58 como del REP/UNI-Cy3. Estas señales de hibridación tampoco fueron modificadas por incrementar la temperatura de 25 °C a 37 °C o a 47 °C, ni por aumentar los periodos de hibridación sobre los Biochips de DNA (datos no mostrados).

Después de evaluar por separado la especificidad de cada una de las sondas, se llevaron a cabo ensayos donde dos o las tres secuencias de DNA blanco (DNAbs-L1/16, DNAbs-L1/18 y DNAbs-L1/58) fueron analizadas de manera simultánea sobre la superficie del Biochip de DNA. Las primeras secuencias de DNA blanco que se analizaron simultáneamente sobre los Biochips de DNA fueron el DNAbs-L1/16 y el DNAbs-L1/18, con sus respectivos ONEST/16 y ONEST/18 y el REP/UNI-Cy3, como se esperaba, solo registraron señales de hibridación en aquellos sitios donde las sondas 16-SN y 18-SN fueron inmovilizadas y cuya secuencia es totalmente complementaria a regiones específicas de estas secuencias. Resultados similares fueron obtenidos durante la hibridación simultánea del DNAbs-L1/18 y el DNAbs-L1/58, con sus respectivos ONEST/18 y ONEST/58 y el REP/UNI-Cy3 registrándose señales de hibridación solo en los sitios donde las sondas 18-SN y 58-SN fueron depositadas. De la misma forma, la hibridación simultánea de los tres DNA blanco DNAbs-L1/16, DNAbs-L1/18 y DNAbs-L1/58, con sus respectivos oligonucleótidos estabilizadores ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58 y el REP/UNI-Cy3, registraron señales de hibridación en los 3 sitios esperados donde las sondas 16-SN, 18-SN y 58-SN fueron inmovilizadas. Estos resultados sugieren una alta especificidad de las sondas inmovilizadas sobre la superficie del Biochip de DNA por su secuencia complementaria en las secuencias de DNA blanco viral, aún cuando más de una de estas secuencias estuvo presente (Ver Figura 42).

Con los datos obtenidos de la hibridación de todos estos oligonucleótidos que simulaban regiones específicas del genoma de VPH de alto riesgo ((DNAbs-L1/16, DNAbs-L1/18, DNAbs-L1/58 ONEST/18, ONEST/58) sobre los Biochips de DNA fue posible confirmar una vez más la factibilidad del diseño previamente propuesto para el diagnóstico molecular de estos virus, al menos en ensayos de hibridación virtual y sobre sistemas de hibridación real como los Biochips de DNA.

Tabla 15. Condiciones de hibridación de oligonucleótidos usados como DNA blanco viral sobre los Biochips de DNA.

DNAbs <sup>1</sup> (pmol)			ONEST <sup>2</sup> (pmol)			REP/UNI-Cy3 (pmol)	Soluciones de Hibridación / Lavados		Temperatura °C			Tiempo (H)			Señal de Hibridación	
L1/16	L1/18	L1/58	16	18	58		SSC 3X †	TMAC 5M ‡	25	37	45	4	8	24	SI	NO
200	200	200	200	200	200	200	X	X	X	X	X	X	X	X	X†	X‡
			100	100	100	100	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X†
100	100	100	200	200	200	200	X	X	X			X	X	X	X†	X‡
			100	100	100	100	X	X	X				X	X	X	X†
50	50	50	200	200	200	200	X	X	X			X			X†	X‡
25	25	25	200	200	200	200	X	X	X			X			X†	X‡
12.5	12.5	12.5	200	200	200	200	X	X	X			X			X†	X‡

1= DNABs-L1/16, DNABs-L1/18, DNABs-L1/58 2=ONEST/16, ONEST/18, ONEST/58 †= Hibridación en solución SSC 3X / 0.1 % SDS ‡= Hibridación en solución con TMAC 5M

## ADNbs-L1/16

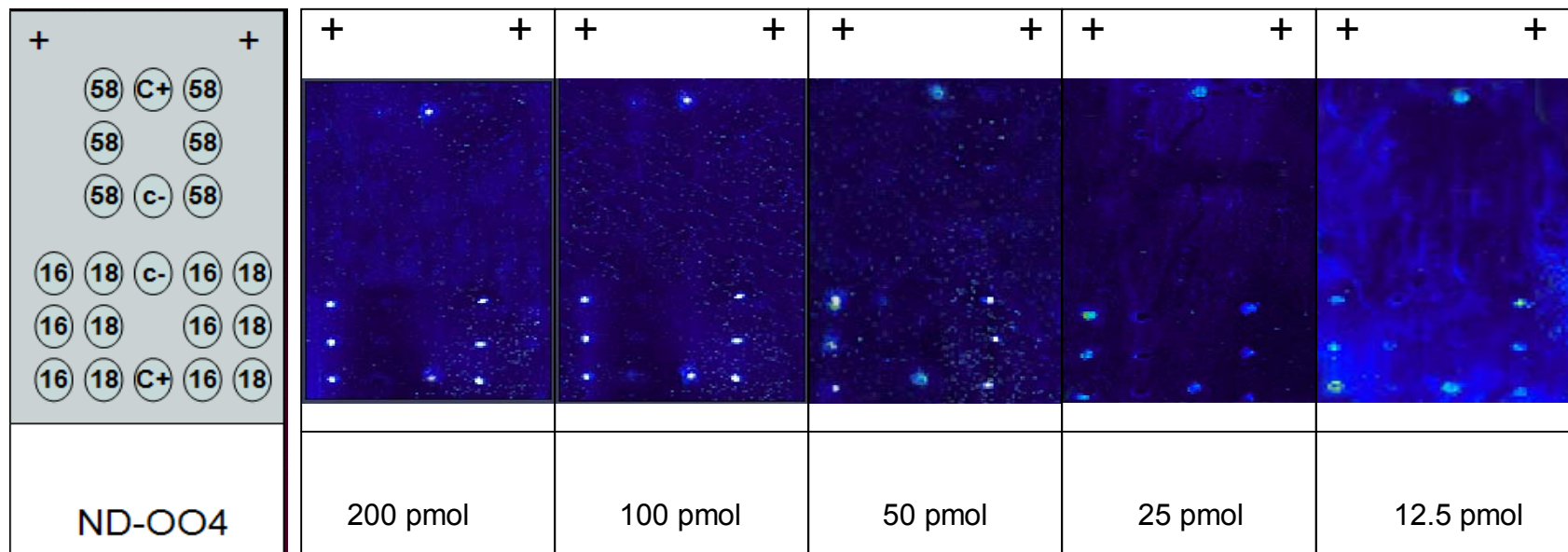


Figura 39. Hibridación de los oligonucleótidos usados como DNA blanco del VPH 16 (DNabs-L1/16), su oligonucleótido estabilizador ONEST/16 y el REP/UNI-Cy3 sobre los Biochips de DNA. A la izquierda se muestra el patrón de inmovilización de las sondas sobre la superficie del Biochip de DNA, a continuación, diferentes concentraciones del DNabs-L1/16, fueron evaluadas sobre los Biochips de DNA. Estas señales fueron registradas después de 4 horas de hibridación en una solución con SSC 3X a 37 °C.

## ADNbs-L1/18

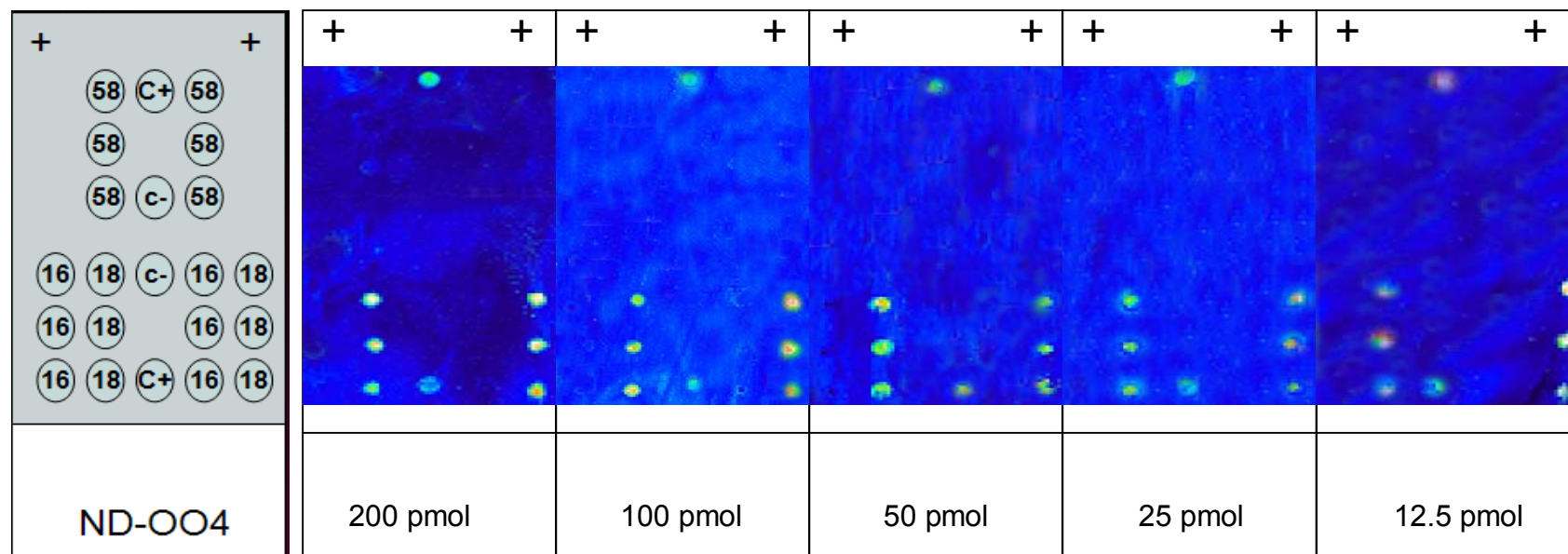


Figura 40. Hibridación de los oligonucleótidos usados como DNA blanco del VPH 18 (DNabs-L1/18), su oligonucleótido estabilizador ONEST/18 y el REP/UNI-Cy3 sobre los Biochips de DNA. A la izquierda se muestra el patrón de inmovilización de las sondas sobre la superficie del Biochip de DNA, a continuación, diferentes concentraciones del DNabs-L1/18, fueron evaluadas sobre los Biochips de DNA. Estas señales fueron registradas después de 4 horas de hibridación en una solución con SSC 3X a 37 °C.

## ADNbs-L1/58

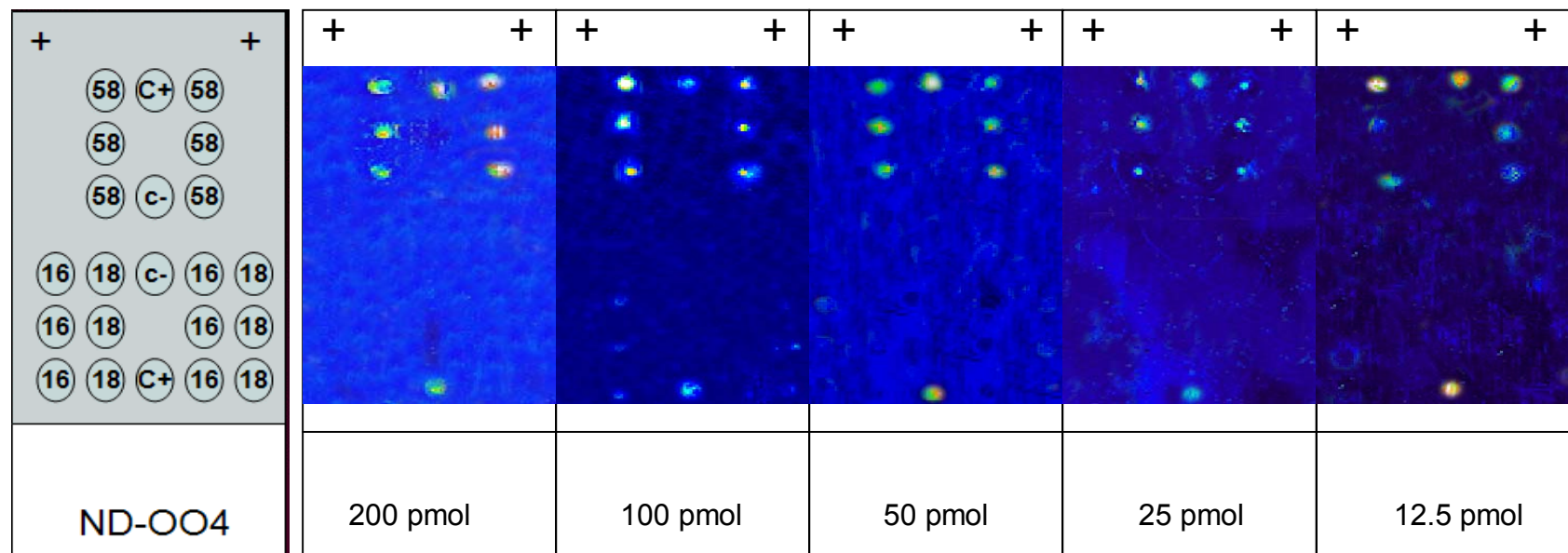


Figura 41. Hibridación de los oligonucleótidos usados como DNA blanco del VPH 58 (DNAbs-L1/58), su oligonucleótido estabilizador ONEST/58 y el REP/UNI-Cy3 sobre los Biochips de DNA. A la izquierda se muestra el patrón de inmovilización de las sondas sobre la superficie del Biochip de DNA, a continuación, diferentes concentraciones del DNABs-L1/58, fueron evaluadas sobre los Biochips de DNA. Estas señales fueron registradas después de 4 horas de hibridación en una solución con SSC 3X a 37 °C.

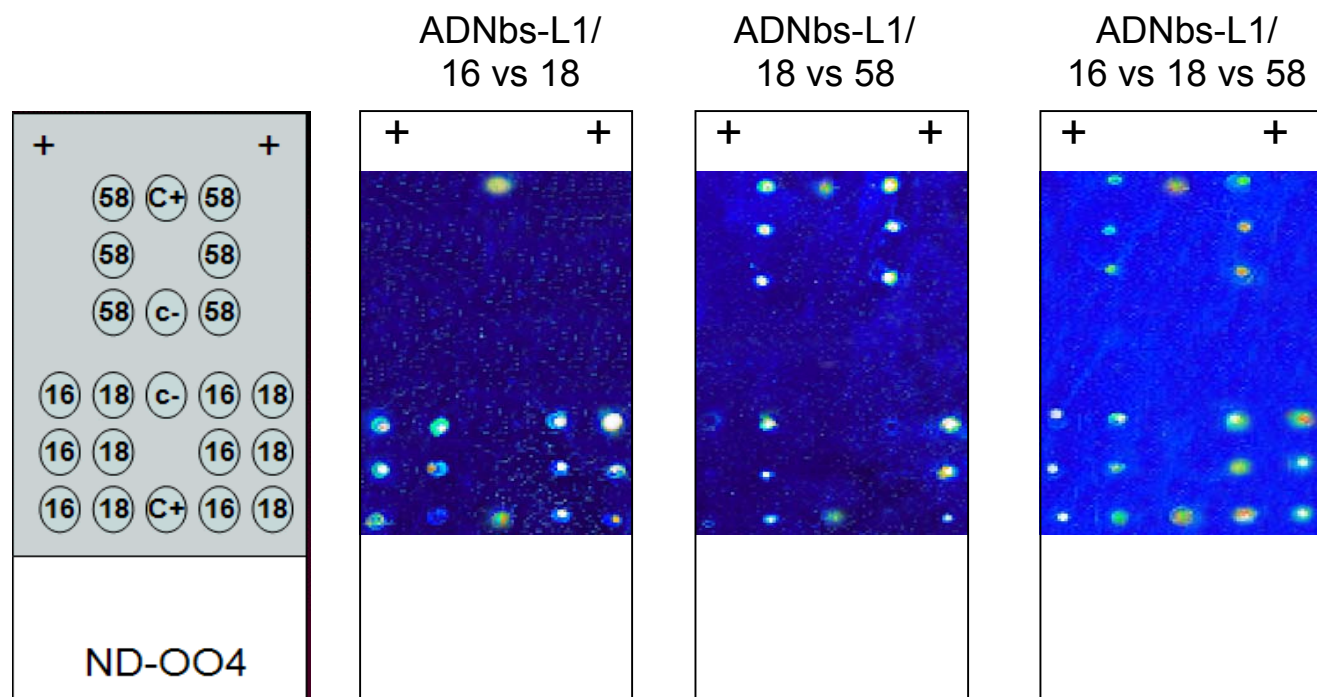


Figura 42. Hibridación simultánea de los oligonucleótidos usados como DNA blanco de los VPH 16, 18 y 58 (DNAbs-L1/16, DNAbs-L1/18 y DNAbs-L1/58), sus respectivos oligonucleótidos estabilizadores ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58 y la secuencia reportera REP/UNI-Cy3 sobre los Biochips de DNA. A la izquierda se muestra el patrón de inmovilización de las sondas sobre la superficie del Biochip de DNA, a continuación podemos observar las señales de hibridación obtenidas a partir de tres diferentes combinaciones entre las secuencias de DNA blanco sintético con sus respectivos oligonucleótidos estabilizadores y el reportero universal marcado. Estas señales fueron registradas después de 4 horas de hibridación en una solución con SSC 3X a 37 °C.

### 8.1.3 Validación del Biochip de DNA.

Después de aprobar la viabilidad del diseño del Biochip de DNA dirigido a la detección molecular de VPH de alto riesgo en ensayos de hibridación virtual y en base al uso de oligonucleótidos cuyas secuencias simulaban fragmentos virales de interés, se procedió a validar su funcionalidad en la detección de fragmentos del gen L1 amplificados por técnicas de PCR de entre 184 y 188 pb mediante iniciadores específicos y a partir de DNA proveniente de líneas celulares y muestras clínicas con CC (Ver Tabla 8 y Figuras 43 a 47).

#### 8.1.3.1 Amplificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16 y 18 a partir de las líneas celulares CaSki y SiHa y un DNA positivo para VPH 18.

Para validar la detección específica de secuencias de VPH de alto riesgo sobre los Biochips de DNA, se usaron como controles positivos dos líneas celulares positivas para VPH 16 CaSki y SiHa y un DNA de VPH 18 clonado dentro del vector pUC18 a partir de las cuales se amplificaron fragmentos específicos del gen L1 viral, la línea celular C-33A negativa para VPH fue usada como control negativo. Para asegurar condiciones de amplificación óptimas se modificaron algunas condiciones de PCR, como la temperatura de alineamiento de los iniciadores, la concentración del DNA templado, la concentración de los iniciadores y la concentración de  $Mg^{+2}$ .

Inicialmente, dos diferentes temperaturas de alineamiento de los iniciadores fueron evaluadas durante los procesos de PCR, 45°C y 55°C. Los amplificados obtenidos a 45°C fueron denominados PCR-1, mientras que los obtenidos a 55°C fueron denominados PCR-2. Ambos amplificados fueron obtenidos con al menos 100 ng del DNA templado y en presencia de 50 pmol de cada uno de los siguientes iniciadores: L1-16f y L1-16r específicos para VPH 16, L1-18f y L1-18r específicos para VPH 18 y L1-58f y L1-58r específicos para VPH 58 (Ver Tabla 8). De acuerdo con nuestros resultados, el proceso de amplificación resultó ser más eficiente bajo las condiciones de la PCR-1, que el observado en la PCR-2 (Ver Figura 43). Aunque en ambas condiciones de PCR fue posible amplificar satisfactoriamente los fragmentos de interés a partir de la línea celular CaSki positiva para VPH 16 y en la muestra de DNA positiva para VPH 18, este no fue el caso de la línea celular SiHa, donde a pesar de haber sido posible la amplificación del fragmento viral de interés en ambas condiciones, esta fue menos eficiente que la obtenida a partir de CaSki y el DNA positivo para VPH 18 (Ver Figura 43).

Como la amplificación de los fragmentos de interés en el gen L1 mostró ser más eficiente bajo las condiciones de la PCR-1, todos los procesos de amplificación posteriores se llevaron a cabo en estas mismas condiciones (Ver Figura 43).



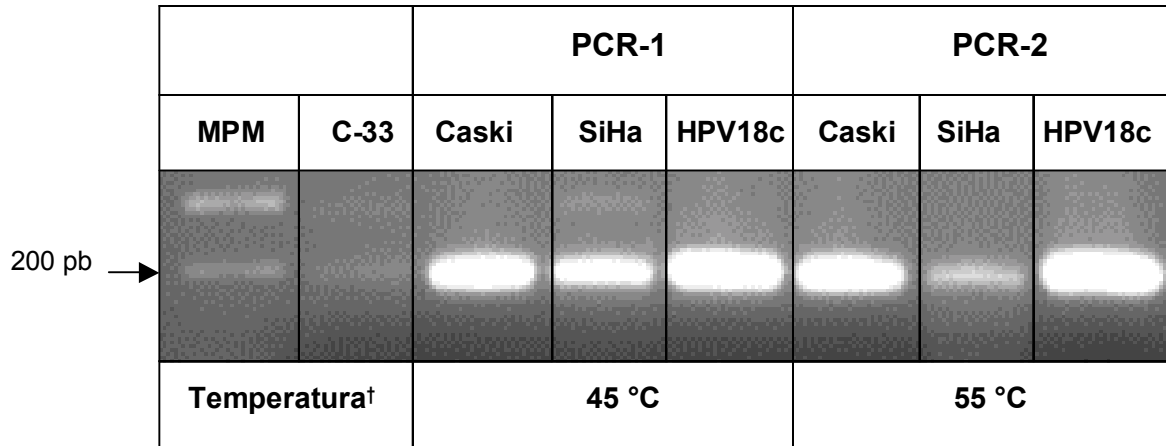


Figura 43. Amplificación por PCR de fragmentos del gen L1 de los VPH 16 y 18 a partir de las líneas celulares CaSki y SiHa y de un DNA de VPH 18 clonado en el vector pUC18 modificando la temperatura de alineamiento de los iniciadores.

La eficiencia de la amplificación de fragmentos específicos del gen L1 a partir de las líneas celulares CaSki y SiHa positivas para VPH 16 y del DNA de VPH 18 se vio favorecida al modificar las condiciones de temperatura de los iniciadores durante los procesos de PCR, sobre todo en aquellos amplificados provenientes de la línea celular SiHa, cuya concentración del producto de amplificación se incrementó al reducir la temperatura de alineamiento de los iniciadores, mientras que en el caso de la línea celular CaSki y el DNA de VPH 18 esta eficiencia se mantuvo constante en ambas condiciones (Ver Figura 43).

Las diferencias en la concentración del producto de amplificación y/o la eficiencia del proceso de amplificación puede estar asociado al número de copias virales disponibles durante los procesos de amplificación. Desde hace varios años, CaSki y SiHa han sido usadas como controles positivos durante el desarrollo de herramientas diagnósticas o terapéuticas, esto ha generado un mayor conocimiento de las características moleculares que las diferencian entre sí, a pesar de que ambas son positivas para VPH 16. Una de las características fundamentales que distingue a estas líneas celulares, es el número de copias virales que están integradas a su DNA celular, ya que mientras que en CaSki es posible encontrar de 60 a 600 copias del genoma del VPH 16, en SiHa solo ha sido posible detectar de 1 a 2 copias de este tipo viral [99]. Esta variabilidad en el número de copias en ambas líneas celulares, puede ser la causa más probable de las diferencias observadas en la concentración del producto de amplificación del gen L1 viral.

Como la eficiencia de la amplificación puede ser el resultado de la disponibilidad de copias virales presentes en la muestra, se realizaron ensayos adicionales donde se valoró el efecto de otros factores como la concentración de DNA genómico (también conocido como DNA molde) y la concentración de los

iniciadores en la obtención del producto de amplificación deseado (Ver Figura 44). En el caso de la línea celular CaSki positiva para VPH 16 y en el DNA positivo para VPH 18, se evaluaron concentraciones de DNA genómico que fueron de los 20 ng hasta los 200 ng, mientras que en el caso de la línea celular SiHa positiva para VPH 16 se manejaron concentraciones de 20 ng hasta 300 ng de DNA genómico. Cada una de estas reacciones de PCR fue evaluada en presencia de 50 y 100 pmol de la mezcla de iniciadores L1-16f, L1-16r, L1-18f, L1-18r, L1-58f y L1-58r.

De acuerdo con nuestros resultados, la eficiencia del proceso de amplificación fue adecuada a lo largo de las diferentes concentraciones de DNA genómico que fueron manejadas, en el caso de la línea celular CaSki y en el caso del DNA positivo para VPH 18 fue posible obtener el producto de amplificación esperado aún bajo concentraciones mínimas de DNA genómico (20 ng). Las concentraciones de amplificado más abundantes fueron obtenidas a partir del DNA positivo para VPH 18 lo que sugiere la presencia de un mayor número de copias virales en esta muestra. En el caso de la línea celular SiHa, también fue posible obtener el producto de amplificación deseado, pero como se esperaba, la eficiencia de amplificación fue menor a la registrada por la línea celular CaSki y por el DNA positivo para VPH 18, debido principalmente al bajo número de copias virales presentes en esta línea celular. Es importante resaltar que aunque la eficiencia de amplificación en SiHa fue baja con respecto a los otros controles positivos, si fue posible obtener el amplificado deseado a lo largo de todas las concentraciones de DNA genómico que fueron evaluadas (20 ng hasta 300 ng) (Ver Figura 44).

En general, la amplificación del fragmento de interés en el gen L1 de los VPH de alto riesgo fue posible hasta con 20 ng de DNA genómico proveniente de las líneas celulares CaSki y SiHa y del DNA positivo para VPH 18, con una amplificación muy eficiente en aquellos casos donde se manejaron 100 y 200 ng de DNA molde. Estos resultados sugieren una alta sensibilidad de nuestra estrategia de PCR, donde a partir de concentraciones mínimas de DNA genómico y el uso de una mezcla de iniciadores específicos fue posible amplificar eficientemente un fragmento específico del gen L1 que posteriormente permitió la detección y tipificación de estos VPH de alto riesgo sobre Biochips de DNA.

De acuerdo con los resultados de la amplificación viral, la sensibilidad de nuestra estrategia es comparable a la obtenida por técnicas de PCR tradicional, donde a partir de iniciadores como los MY09/11, los GP5+/6+ o los SPF's, es posible identificar a la mayoría de los VPH que han sido descritos, con la ventaja de que el uso de iniciadores específicos para los VPH 16, 18 y 58 incrementa la especificidad del producto de amplificación y evita la amplificación preferencial de ciertos tipos de VPH que puedan producir resultados inespecíficos, además incluye regiones con la variabilidad suficiente para diferenciar específicamente un tipo viral de otro y al no ser de gran tamaño, es factible de obtener, incluso, en muestras con DNA de baja calidad [7, 41, 78, 79, 81].

En lo que respecta al efecto de la concentración de los iniciadores en la eficiencia de amplificación viral, por lo general no se observaron diferencias en la concentración del producto de amplificación al usar 50 o 100 pmol de cada uno de los iniciadores a lo largo de las diferentes concentraciones de DNA celular que fueron evaluadas, al menos no en el caso de la línea celular CaSki y en el DNA positivo para VPH 18. En el caso particular de SiHa si se observaron ligeras diferencias en la concentración del producto de amplificación al usar 100 pmol de cada uno de los iniciadores, sin embargo estas diferencias fueron mínimas (Ver Figura 44).

Como el uso de grandes concentraciones de iniciadores (100 pmol) no reflejó un incremento significativo en la concentración del producto de amplificación de interés en el gen L1 durante los ensayos de PCR y en cambio, si generaba un desperdicio excesivo de los mismos, se decidió que todas las amplificaciones posteriores se llevarían a cabo con tan solo 50 pmol de la mezcla de iniciadores (Ver Figura 44).

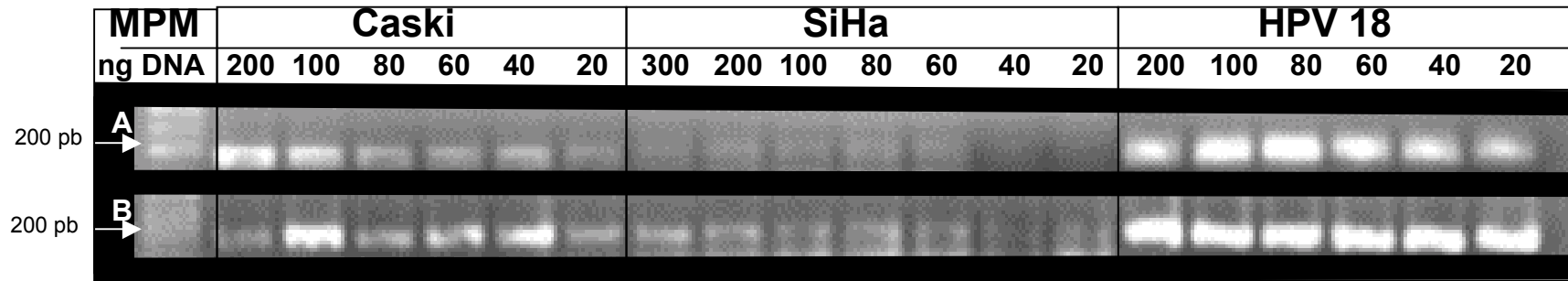


Figura 44. Amplificación por PCR de fragmentos específicos del gen L1 a partir de diferentes concentraciones de DNA genómico proveniente de las líneas celulares CaSki y SiHa positivas para VPH 16 y de un DNA positivo para VPH 18. Tanto en A, como en B diferentes concentraciones del DNA genómico fueron evaluadas durante el proceso de amplificación. Las amplificaciones en A se llevaron a cabo en presencia de 50 pmol de cada uno de los iniciadores (L1-16f, L1-16r, L1-18f, L1-18r, L1-58f, L1-58r), mientras que en B se manejaron 100 pmol de cada uno de ellos.

### 8.1.3.2 Amplificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 a partir de muestras clínicas con CC.

En las últimas décadas numerosas estrategias de PCR para detectar y cuantificar VPH en muestras clínicas han sido desarrolladas, sin embargo la mayoría de estos métodos requieren de muchas horas de trabajo, son poco sensibles y no necesariamente apropiados para la detección viral en estudios a gran escala, además registran una baja eficiencia en la detección de infecciones múltiples [101, 102]. Algunos como los GP5+/6+ detectan solo el 47 % de las muestras con más de un tipo viral en comparación con el 90 % que son capaces de detectar los MY09/11 [37]. Se sabe que la sensibilidad y especificidad de los métodos basados en PCR pueden variar dependiendo no solamente de los iniciadores utilizados, sino también de la calidad del DNA extraído, del tamaño del producto de PCR, las condiciones de reacción, el desempeño de la DNA polimerasa usada en la reacción, los diferentes tipos de VPH amplificados y su habilidad para detectar múltiples tipos [37, 41]. Es por ello que nuestro sistema de amplificación propone el uso de una mezcla de iniciadores específicos dirigidos contra los VPH 16, 18 y 58 que favorezcan la amplificación tanto de tipos virales con un alto número de copias como de aquellos presentes en bajas concentraciones.

Inicialmente, la eficiencia de esta estrategia de amplificación viral fue valorada en las líneas celulares CaSki y SiHa positivas para VPH 16 y 18 y en un DNA positivo para VPH 18, el siguiente paso fue evaluar esta eficiencia pero a partir de la amplificación de fragmentos virales presentes en muestras clínicas con CC. Para ello, un total de 91 muestras de DNA genómico proveniente de pacientes con CC fueron sometidas a la amplificación de fragmentos específicos del gen L1 bajo condiciones de PCR previamente establecidas (al menos 100 ng de DNA genómico, en presencia de 50 pmol de los iniciadores L1-16f, L1-16r, L1-18f, L1-18r, L1-58f y L1-58r y bajo las mismas condiciones de amplificación de la PCR-1) (Ver Tabla 8).

De todas las muestras clínicas analizadas, 72 (79.1 %) resultaron ser positivas para alguno de los VPH 16, 18 o 58, las 19 restantes (20.9%) resultaron ser negativas al menos para estos tipos virales, una frecuencia similar a la reportada a nivel mundial [1-11, 21, 23, 104] (Ver Figura 45). De acuerdo con datos actuales, la prevalencia de infección por VPH 16 en muestras clínicas con CC se encuentra en un intervalo de variación mundial que va del 7.5 % al 86 %, mientras que la del VPH 18 varía entre un 6.7 % y un 22 % y la del VPH 58 entre un 1.8 % y un 16 % [3-6, 11, 23-27, 102-105]. Estos datos apoyan el hecho de que estos tres tipos virales pueden ser los responsables de alrededor del 90 % de los casos con CC, lo que tendría importantes implicaciones en la implantación de estrategias diagnósticas que incluyan estos tipos virales, una cuestión que podría prevenir una importante proporción de los casos con CC [21, 104]. Existen reportes que indican que, en conjunto, los tipos 16, 18, 45, 31, 33, 52, 58 y 35 representan más del 95 % de la prevalencia de infecciones por VPH en CC [11]. De aquí la importancia de implementar novedosas herramientas moleculares que faciliten la detección y tipificación de estos tipos virales.

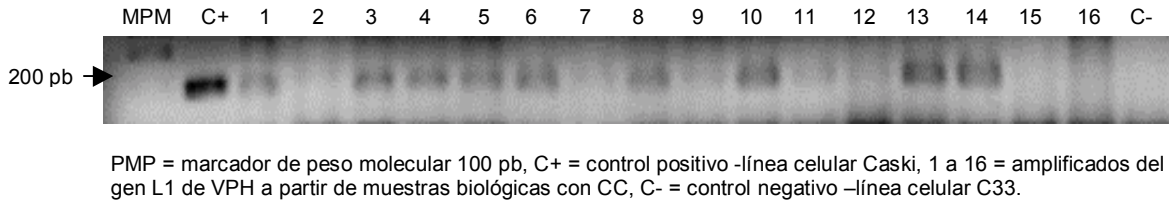


Figura 45. Amplificación específica de fragmentos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 a partir de DNA genómico proveniente de pacientes con CC.

Al igual que ocurrió con las líneas celulares, la amplificación de fragmentos específicos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 a partir de muestras clínicas con CC reportó diferencias en la concentración del producto de amplificación viral esperado a lo largo de las muestras analizadas, aún cuando se obtuvieron a partir de la misma concentración de DNA genómico (100 ng) y bajo las mismas condiciones experimentales (Ver Figura 45). Para una mejor visualización de estos resultados, muestras con similares niveles de amplificación fueron seleccionadas y ordenadas en dos grupos, el primero incluyó los productos de amplificación cuya concentración fue considerada como óptima, mientras que en el segundo abarcó muestras con bajos niveles de amplificación viral (Ver Figura 46). Estos resultados, al igual que en el caso de las líneas celulares CaSki y SiHa, sugieren diferencias en el número de copias virales presentes en cada una de las muestras analizadas, un factor que sin duda puede afectar tanto la eficiencia del proceso de amplificación, como la detección y tipificación de estos VPH sobre los Biochips de DNA.

Aunque la eficiencia de amplificación no fue la misma en todas las muestras clínicas analizadas, todos los productos de PCR obtenidos ya sea, con altos o bajos niveles de amplificación viral, fueron sometidos a su análisis sobre los Biochips de DNA.

Como la eficiencia de los procesos de amplificación está fuertemente asociada con el número de copias virales presentes en las muestras clínicas y como el número de copias esta asociado al número de células o al DNA genómico obtenido de las muestras, fue necesario realizar ensayos de amplificación donde diferentes concentraciones de DNA genómico fue analizado.

En base a los niveles de amplificación viral previamente obtenidos, dos muestras clínicas denominadas MC-1 y MC-2 fueron seleccionadas para evaluar la eficiencia de nuestra estrategia de amplificación pero bajo diferentes concentraciones de DNA genómico proveniente de muestras clínicas de CC. En

amplificaciones previas, la muestra MC-1 registró niveles de amplificación adecuados, mientras que en la muestra MC-2 los niveles de amplificación fueron muy bajos comparados con los registrados para otras muestras analizadas bajo las mismas condiciones experimentales (Ver Figuras 45 y 46).

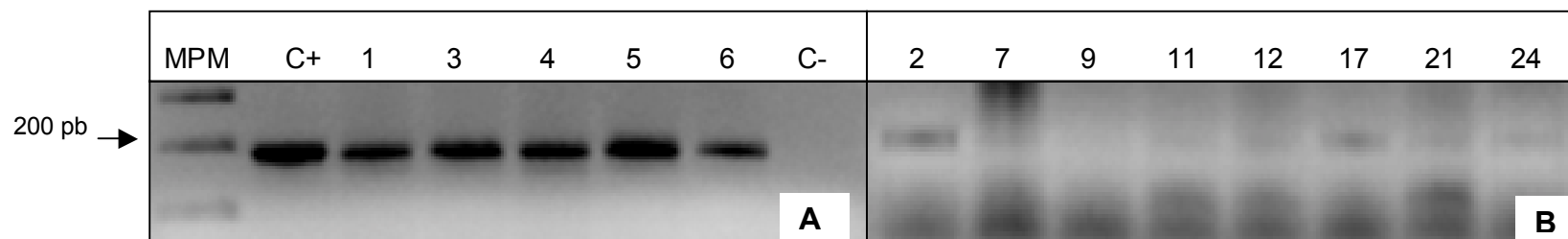
En el caso de la muestra MC-1, las concentraciones analizadas fueron 40, 60, 80, 100, 200, 400 y 600 ng de DNA molde. En el caso de la muestra MC-2 las concentraciones manejadas fueron 40, 60, 80, 100, 200, 400, 600 y 1200 ng de DNA molde. Estas concentraciones fueron seleccionadas en base a la disponibilidad del DNA genómico de las muestras clínicas (Ver Figura 47).

Las diferencias registradas en los niveles de amplificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 obtenidos a partir las muestras clínicas con CC sugieren una gran diferencia en el número de copias de los VPH 16, 18 y 58 presentes en las muestras analizadas, ya que mientras en la muestra MC-1 fue posible obtener el producto de PCR esperado a lo largo de cada una de las concentraciones de DNA genómico que fueron evaluadas (40, 60, 80, 100, 200, 400 y 600 ng), en la muestra MC-2 esto solo fue posible en aquellos casos donde se manejaron concentraciones de DNA molde superiores a los 200 ng. En la muestra MC-1, niveles de amplificación adecuados fueron observados a partir de 200 ng de DNA molde, mientras que en la muestra MC-2 esto solo ocurrió cuando más de 600 ng del DNA genómico fueron utilizados (Ver Figura 47).

Después de someter los controles positivos (CaSki, SiHa y DNA de VPH 18) y las muestras clínicas con CC a amplificaciones específicas de fragmentos del gen L1 por técnicas de PCR convencional, cada uno de los amplificados obtenidos fue sometido nuevamente a procesos de síntesis cíclica mediante PCR donde a partir de 4  $\mu$ L del amplificado previo y usando solo los iniciadores L1-16f, L1-18f y L1-58f fue posible generar un elevado número de copias virales de cadena sencilla que garantizaran la detección y tipificación de VPH de alto riesgo sobre los Biochips de DNA (Ver Figura 48). Los ensayos de síntesis cíclica resultaron ser muy eficientes tanto en los controles positivos, como en las muestras clínicas a lo largo de las diferentes concentraciones de DNA genómico que fueron evaluadas.

En general, la eficiencia de los procesos de síntesis cíclica, fue mayor cuando los productos de amplificación fueron obtenidos a partir de líneas celulares, que cuando fueron obtenidos a partir de muestras clínicas, aun cuando estos fueron obtenidos bajo concentraciones mínimas de DNA genómico. Una alta eficiencia del proceso de síntesis cíclica en las muestras clínicas solo fue observado cuando los amplificados provenían de altas concentraciones de DNA genómico (Ver Figura 48).

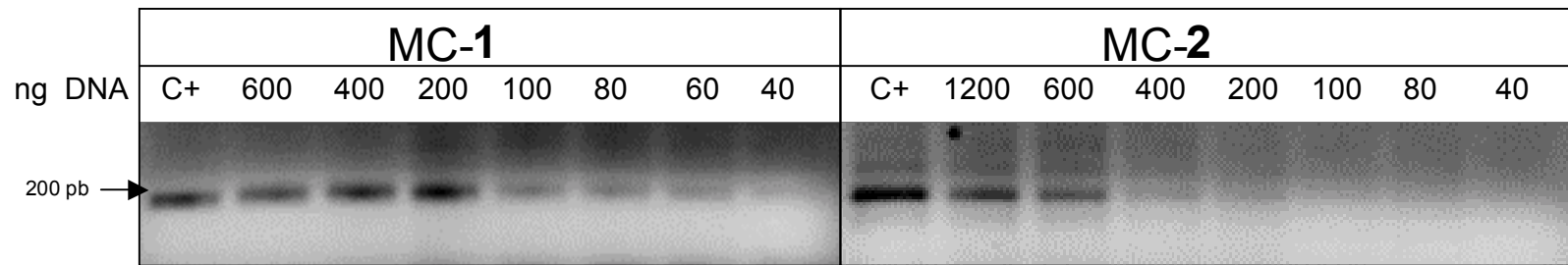
Los productos obtenidos durante los ensayos de síntesis cíclica representan los fragmentos virales que finalmente fueron sometidos a hibridación sobre los Biochips de DNA con la finalidad de detectar y tipificar un grupo de VPH de alto riesgo.



MPM = marcador de peso molecular 100 pb, C+ = control positivo –línea celular Caski, C- = control negativo –línea celular C33, 1 a 24 = amplificados del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 obtenidos a partir de muestras clínicas con CC

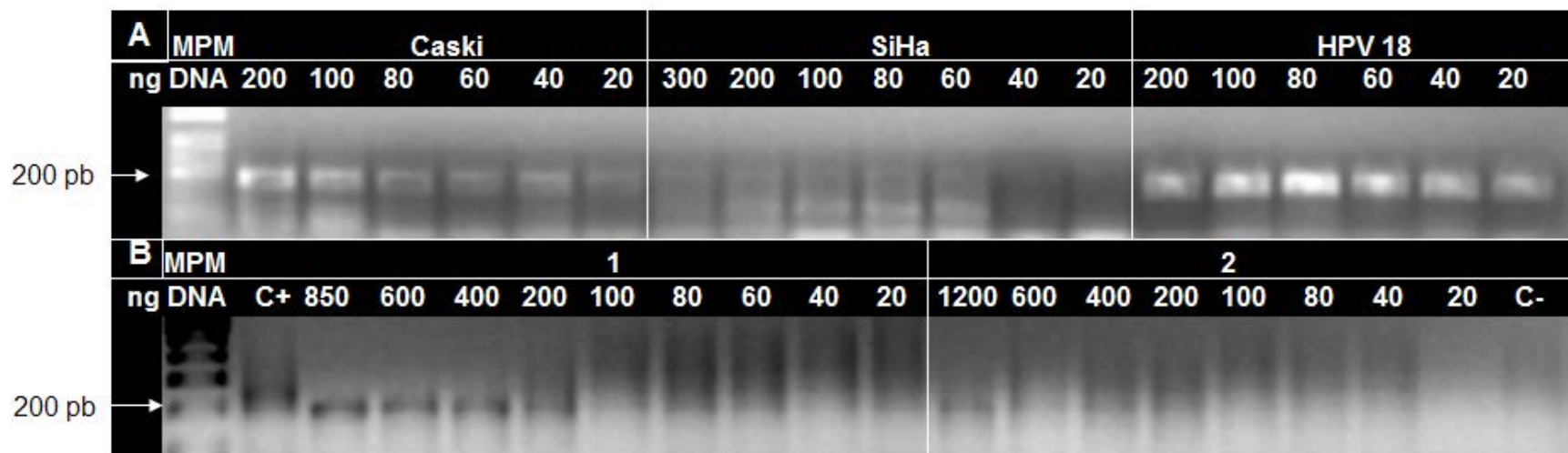
Figura 46. Diferencias registradas en los niveles de amplificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 obtenidos a partir de muestras clínicas con CC. En A se muestran los productos de PCR con óptimos niveles de amplificación viral, en B se muestran los productos de PCR con bajos niveles de amplificación viral.





MC-1, MC-2 = Muestras clínicas con CC

Figura 47. Amplificación de fragmentos específicos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 a partir de diferentes concentraciones de DNA genómico proveniente de dos muestras clínicas con CC.



MPM = Marcador de peso molecular 100 pb, Caski y SiHa = líneas celulares positivas para VPH16, HPV 18 = muestra de ADN positivo para VPH 18, C+ = muestra de ADN positiva para VPH 18, C- = control negativo -línea celular C33 negativa para VPH, 1 y 2 = ADN de muestras clínicas con CC.

Figura 48. Síntesis cíclica de fragmentos de amplificación del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 obtenidos a partir de diferentes concentraciones de DNA genómico de líneas celulares y muestras clínicas con CC. En A se muestran los productos obtenidos a partir de amplificadores virales de las líneas celulares CaSki, SiHa y un DNA positivo para VPH 18, en B se muestran los productos obtenidos a partir de amplificadores virales de muestras clínicas con CC.

### **8.1.3.3 Detección y tipificación de VPH de alto riesgo a partir de amplificadores virales provenientes de las líneas celulares CaSki y SiHa sobre los Biochips de DNA.**

Después de amplificar exitosamente fragmentos específicos del gen L1 a partir de líneas celulares positivas para los VPH 16 y 18, el siguiente paso fue evaluar la funcionalidad del Biochip de DNA dirigido a la detección y tipificación de VPH considerados de alto riesgo en CC. Para ello, cada uno de los productos de amplificación viral previamente obtenidos bajo diferentes concentraciones de DNA genómico proveniente de las líneas celulares CaSki y SiHa y de un DNA positivo para VPH 18, fueron sometidos a hibridación sobre los Biochips de DNA.

Después de la hibridación de los amplificadores virales previamente obtenidos, señales de hibridación específicas fueron registradas en los sitios esperados sobre la superficie de los Biochips de DNA. En el caso de las líneas celulares CaSki y SiHa, señales de hibridación fueron detectadas en el área de inmovilización de las sondas que identifican al VPH 16 (16-SN), mientras que en el caso del DNA positivo para VPH 18, registró señales de hibridación solo en aquellos sitios donde se inmovilizaron sondas que identifican a este tipo viral (18-SN) (Ver Figura 49).

A pesar de que la línea celular SiHa reportó bajos niveles de amplificación viral en ensayos previos, fue posible identificar señales de hibridación específica sobre los Biochips de DNA en los sitios donde las sondas 16-SN que identifican al VPH 16 fueron inmovilizadas. Esto ocurrió en todos los amplificadores provenientes de esta línea celular, aun cuando los amplificadores fueron obtenidos bajo concentraciones mínimas de DNA celular (20 ng). Con respecto a línea celular CaSki, además de registrarse señales de hibridación específica para el VPH 16, también se identificaron señales de hibridación en aquellos sitios donde se inmovilizaron las sondas que identifican al VPH18 (18-SN), aunque esto solo fue observado en amplificadores provenientes de altas concentraciones de DNA celular (200 ng). Estos resultados confirman la presencia de VPH 16 en las líneas celulares CaSki y SiHa, pero también la presencia de VPH 18 en el caso particular de CaSki y en el DNA positivo para VPH 18 (Ver Figura 49).

La presencia de VPH 16 en las líneas celulares CaSki y SiHa ya había sido previamente reportada, sin embargo existe una gran diferencia en el número de copias de estos tipos virales que las herramientas moleculares han podido detectar [19, 33-40, 79-81, 106, 107]. Un bajo número de copias del VPH 16 ha sido reportado para la línea celular SiHa (1 a 2 copias) comparado con el alto número de copias reportado en la línea celular CaSki (500-600 copias) y aunque se sabe que CaSki contiene algunas copias del VPH 18, aún no existen datos precisos de cuantas [99].

Un dato muy interesante es el hecho de que el Biochip de DNA que proponemos para la identificación de VPH de alto riesgo fue capaz de detectar la presencia tanto del VPH 16, como del VPH 18 en amplificadores provenientes de la línea celular CaSki, aun cuando se sabe que el número de copias del VPH 18 es mucho

mas bajo que el previamente reportado para el VPH 16 (Ver Figura 49). Estos resultados sugieren la posibilidad de detectar sobre los Biochips de DNA, infecciones con más de un tipo de VPH usando al menos 200 ng de DNA genómico durante los procesos de amplificación, un resultado de gran relevancia en el diagnóstico clínico. Además, el hecho de no registrar señales de hibridación inespecífica durante la hibridación de los amplificadores de las líneas celulares CaSki y SiHa positivas para VPH 16 y 18 y del DNA de VPH 18 y la factibilidad de identificar la presencia de infecciones con más de un tipo viral en un mismo ensayo de hibridación, sugieren una elevada especificidad y sensibilidad del Biochip de DNA en la detección y tipificación de VPH de alto riesgo.

#### **8.1.3.4 Detección y tipificación de VPH de alto riesgo a partir de amplificadores virales provenientes de muestras clínicas con CC sobre los Biochips de DNA.**

Después de validar la funcionalidad del Biochip de DNA en la detección y tipificación viral a partir de amplificadores provenientes de las líneas celulares CaSki, SiHa, positivas para VPH 16 y un DNA positivo para VPH 18, el siguiente paso fue evaluar la eficiencia de nuestro sistema pero ahora en amplificadores provenientes de muestras clínicas con CC. Un total de 72 amplificadores del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 previamente obtenidos a partir de muestras clínicas con CC fueron evaluados sobre los Biochips de DNA.

Al igual que con amplificadores provenientes de líneas celulares, una serie de amplificadores obtenidos a partir de diferentes concentraciones de DNA genómico de las muestras clínicas MC-1 y MC-2 fueron inicialmente analizadas sobre los Biochips de DNA. De esta manera productos de amplificación obtenidos a partir de 20 y hasta 1200 ng de DNA genómico provenientes de una misma muestra fueron evaluadas sobre los Biochips de DNA (Ver Figuras 47, 48 y 50). La hibridación de cada uno los amplificadores estos amplificadores sobre los Biochips de DNA permitió detectar señales positivas aún cuando los productos de PCR fueron obtenidos bajo mínimas concentraciones de DNA molde (20 ng) e incluso cuando estos no pudieron ser visualizado previamente en los geles de agarosa (Ver Figuras 47, 48 y 50).

De acuerdo con las señales de hibridación, los amplificadores provenientes de la muestra MC-1 fueron positivos para VPH 16 y aunque ligeras señales de hibridación fueron detectadas en los sitios que reconocen al VPH 18, estas solo fueron identificadas en amplificadores provenientes de altas concentraciones de DNA genómico (600 ng) y pudieron ser eliminadas mediante lavados adicionales. Los amplificadores provenientes de la muestra MC-2 sometidos a hibridación sobre los Biochips de DNA dieron señales de hibridación positivas tanto para el VPH 16 como para el VPH 18, aunque una mayor intensidad fue registrada en el área de las sondas (18-SN) que reconocen al VPH 18. Estos resultados sugieren la presencia de los VPH 16 y 18 en la muestra MC-2, aunque al parecer, el VPH 18 presenta un mayor número de copias con respecto al VPH 16.

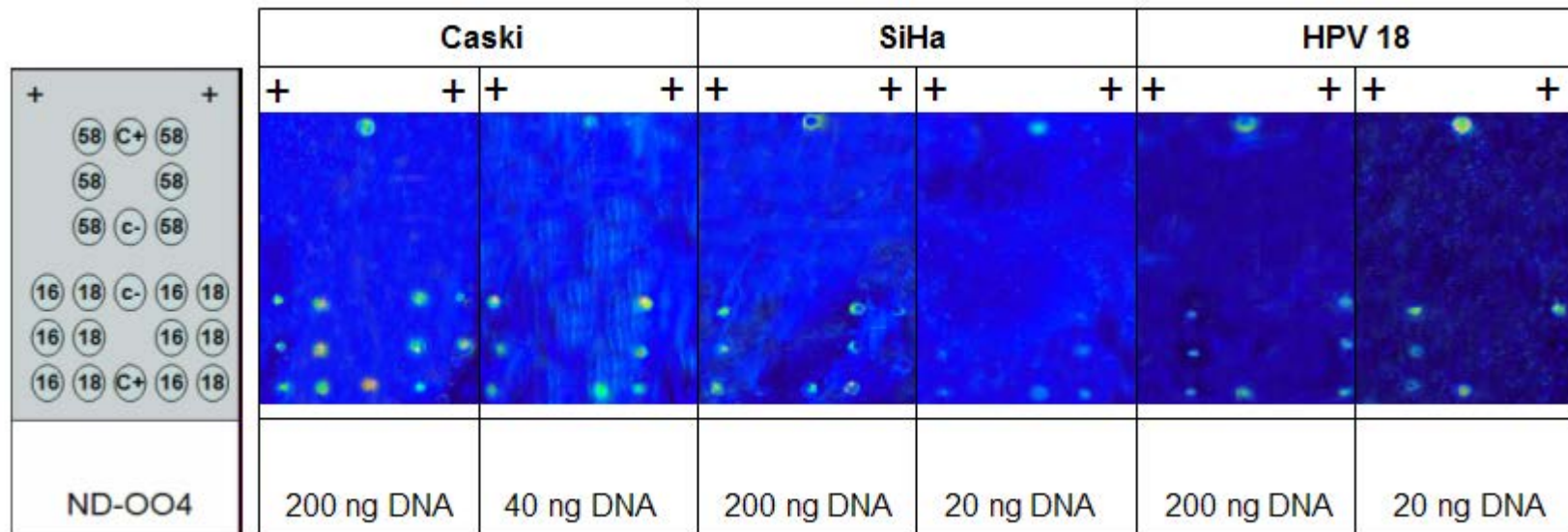


Figura 49. Detección y tipificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16 y 18 obtenidos a partir de las líneas celulares CaSki, SiHa y un DNA positivo para VPH 18 sobre los Biochips de DNA.

La intensidad de las señales registradas sobre los Biochips de DNA se mantuvo similar a lo largo de los diferentes amplificadores evaluados, solo se detectó una disminución en la intensidad de la señal cuando el amplificador provenía de bajas concentraciones de DNA genómico (40 y 20 ng), esta diferencia puede ser explicadas en función del número de copias virales disponibles al momento de amplificación (Ver Figura 50). Como la intensidad de las señales de hibridación fue observada de manera satisfactoria en todos los amplificadores provenientes de las muestras clínicas MC-1 y MC-2 (desde 20 ng hasta 1200 ng) se acordó que el resto de los amplificadores a evaluar sobre los Biochips de DNA serían obtenidos a partir de al menos 100 ng de DNA genómico proveniente de las muestras clínicas con CC.

De acuerdo con la hibridación del resto de los amplificadores virales previamente obtenidos de las muestras clínicas con CC sobre los Biochips de DNA, el 89 % resultó positiva para alguno de los tres VPH 16, 18 o 58, 36 registraron señales de hibridación para un solo tipo viral (50 %), 28 para más de un tipo viral (38.9 %) y 8 no pudieron ser identificados (11.1 %) (Ver Tabla 16). El VPH 16 resultó ser el más frecuentemente identificado (68%), seguido de los VPH 18 y 58. De las infecciones simples identificadas, 29 (40.3 %) resultaron ser positivas para el VPH 16, 5 (6.9 %) para VPH 18 y 2 (2.8 %) para VPH 58. En lo que respecta a las infecciones con más de un tipo viral, 21 amplificadores fueron positivos para 2 de los VPH de interés (29.2%) y 7 para alguno de los 3 VPH analizados (9.7%). De las infecciones dobles, 13 correspondieron a los VPH 16 y 18 (18.0%), 6 a los VPH 16 y 58 (8.3%) y 2 a los VPH 18 y 58 (2.8%) (Ver Tabla 16).

Tabla 16. Frecuencia de VPH de alto riesgo identificados sobre los Biochips de DNA.

<b>Detección de VPH de alto riesgo sobre Biochips de DNA</b>				
<b>Tipo VPH</b>	<b>Infecciones Simples (%)</b>	<b>Infecciones Múltiples (%)</b>	<b>No Identificadas (%)</b>	<b>Totales (%)</b>
16	29 (40.3)			
18	5 (6.9)			
58	2 (2.8)			
16 / 18		13 (18.0)		
16 / 58		6 (8.3)		
18 / 58		2 (2.8)		
16 / 18 / 58		7 (9.7)		
No identificadas			8 (11.1)	
<b>Totales</b>	<b>36 (50.0)</b>	<b>28 (38.9)</b>	<b>8 (11.1)</b>	<b>72 (100)</b>

La frecuencia de infecciones simples identificadas sobre los Biochips de DNA fue similar a la obtenida en estudios previos realizados sobre este mismo tipo de plataformas [58-68]. La frecuencia de infecciones con más de un tipo viral fue comparable a la reportada en dos estudios donde se evalúa la prevalencia de infecciones por VPH en poblaciones de Costa Rica y Argentina, pero mayor a la reportada en estudios de prevalencia de infecciones por VPH en muestras con CC [58-64, 111-114]. Al igual que otros estudios, los VPH 16, 18 y 58 fueron frecuentemente identificados en muestras clínicas con CC [58-60].

En estos momentos, cada una de las muestras clínicas con CC que fueron analizadas sobre los Biochips de DNA continúa siendo procesada con la finalidad de obtener las secuencias de los fragmentos del gen L1 que garanticen la factibilidad diagnóstica de nuestro sistema en la detección y tipificación de VPH de alto riesgo. Aunque análisis preliminares de algunas de estas secuencias confirman la sensibilidad y especificidad del Biochip de DNA en la detección y tipificación específica de los VPH 16, 18 y 58 (Ver Figuras 51 a 53).

Aunque la detección de infecciones por múltiples tipos de VPH ha sido previamente reportada, aún se sabe poco acerca de la frecuencia de la coinfección y de si ciertos tipos de VPH tienen mayor o menor probabilidad de adquirirse al mismo tiempo. Se ha reportado que el presentar infecciones con más de un tipo de VPH no confiere mayor riesgo de CC en comparación con quienes presentan infección con un solo tipo viral, ya existen reportes donde el riesgo de CC es mayor en aquellos casos con infecciones múltiples en relación con los que presentan un solo tipo viral, un hecho que sugiere que la presencia simultánea de múltiples tipos de VPH contribuye al desarrollo o progresión de la neoplasia cervical [60, 109-117]. Entre las causas que podrían favorecer la infección con más de un tipo de VPH se incluye la presencia de algún mecanismo biológico por el cual la adquisición de un tipo viral facilite la adquisición de otro tipo, diferencias en la susceptibilidad del hospedero, un elevado número de parejas sexuales recientes, edad menor a treinta años e inicio temprano de su vida sexual, aunque también puede estar relacionada con la edad [59, 109, 110].

Existen reportes que indican que el riesgo de presentar CC se incrementa de 40 a 180 veces entre quienes presentan una infección por VPH de alto riesgo y 100 veces mayor en aquellas pacientes con VPH 16 en relación a quienes no la presentan, de aquí la importancia de diagnosticar este tipo de infecciones en lesiones premalignas [3-5, 10, 11].

A la fecha solo un Biochip de DNA dirigido a la detección y tipificación de VPH es viable a nivel comercial, el *HPV Oligonucleotide Microarray* también conocido *HPV DNA Chip Microarray*. La utilidad y practicidad de este método continua siendo evaluada, aunque datos preliminares demuestran una alta sensibilidad y un elevado potencial de detección de muestras con más de un tipo viral. Aunque en este tipo de plataforma es posible imprimir un gran número de oligonucleótidos tipo-específicos que permiten tipificar con mayor precisión a los VPH, realizar un análisis semicuantitativo de la señal y por lo tanto de la carga viral, aún se reporta

la presencia de reacciones de hibridación inespecíficas por lo que las señales pueden estar sujetas a variación lo que hace necesaria la aplicación de algunas estrategias de normalización, además el formato actual requiere de equipo muy costoso para su fabricación, lo que de entrada reduce su aplicación en laboratorios clínicos y de investigación [37].

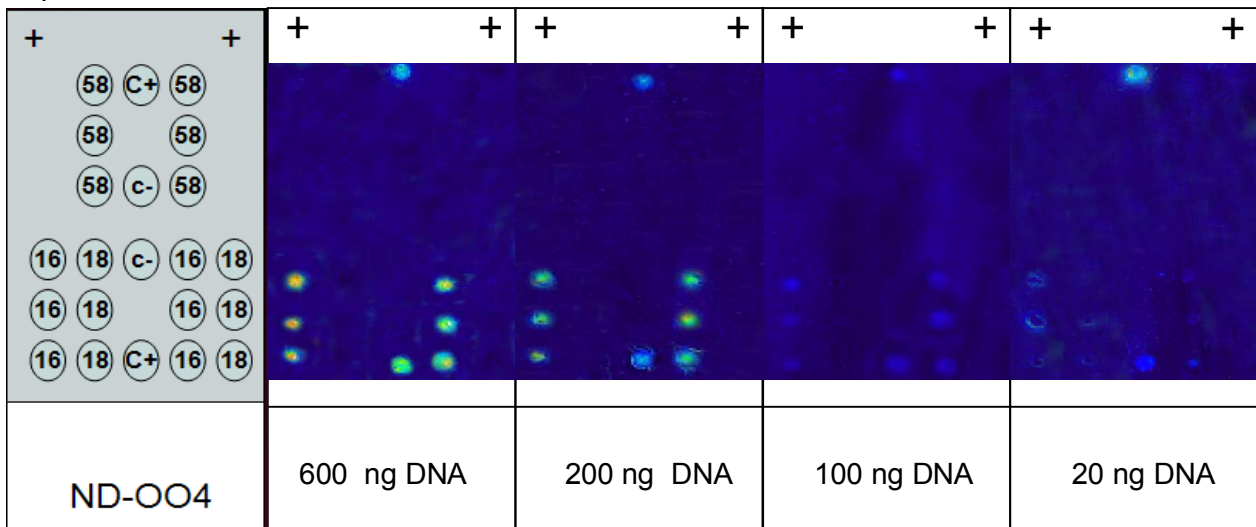
En estudios donde se ha comparado la eficiencia del *HPV oligonucleotide microarray* frente a otros métodos usados para la detección de VPH, se ha reportado que su efectividad es comparable a la que ofrece la HC2, la PCR-RFLP y la Real-Time PCR [37, 59, 63, 64]. Actualmente los *HPV oligonucleotide microarrays* reportan una gran sensibilidad en la detección de HGSIL y CC (entre el 78.5 y 96 %) muy similar a la HC2 (entre el 78 y 95 %) y superior a la citología (entre el 64.5 y 88 %), sin embargo la especificidad que ofrecen continua siendo baja (entre 52 y 74 %) [58, 60]. Se ha demostrado que la detección molecular del VPH como una prueba adyuvante al Papanicolaou es un indicador más sensible para identificar HGSIL que la citología convencional y que una combinación de ambas ofrece casi el 100% de sensibilidad. Las pruebas para determinación de VPH posiblemente se conviertan en la estrategia más común de tamizaje en programas poblacionales de detección oportuna de cáncer, mientras tanto la investigación continua para mejorar la sensibilidad y costo-efectividad de los métodos actuales de detección viral [36].

En un ensayo el nivel de sensibilidad se define como el límite de detección o la cantidad mínima de DNA disponible que puede ser detectada, mientras que la especificidad determina el nivel de precisión [35]. Actualmente, la HC2 es capaz de detectar entre  $5 \times 10^4$  Y  $5 \times 10^7$  copias de DNA viral, sin embargo su sensibilidad no cubre el rango observado en las muestras clínicas (alrededor de  $10^2$  a  $10^9$  copias) [116]. En este sentido el Biochip de DNA que proponemos fue capaz de detectar de 3 400 a 204 000 copias de ADN viral en amplificadas provenientes de las líneas celulares CaSki y SiHa a partir de 20 y hasta 300 ng de DNA celular y hasta 17 000 copias virales en amplificadas provenientes de 100 ng de DNA genómico de muestras clínicas con CC, lo que se traduce en una sensibilidad tres veces mayor a la reportada por la HC2. Estos resultados sugieren que el Biochip de DNA que proponemos para la detección y tipificación de VPH de alto riesgo es más sensible que otros sistemas de detección viral como la HC2 y mucho más específico, con la ventaja adicional de ser una estrategia factible de aplicar en cualquier laboratorio clínico y de investigación a costos muy accesible.

La aplicación de los Biochips de DNA al diagnóstico clínico pretende implementar métodos fiables que permitan detectar la mayoría de las infecciones (incluyendo infecciones subclínicas y latentes) con una mayor sensibilidad y especificidad, con la ventaja de identificar y discriminar VPH de alto riesgo y la presencia de infecciones con más de un tipo viral, todo en un mismo ensayo. Este Biochip de DNA representa una poderosa herramienta molecular que aplicada al tamizaje primario de lesiones cervicales en colaboración con otras estrategias de diagnósticas como el papanicolaou y la colposcopia podría contribuir a la reducción de la incidencia y mortalidad del CC.



A) MC-1



B) MC-2

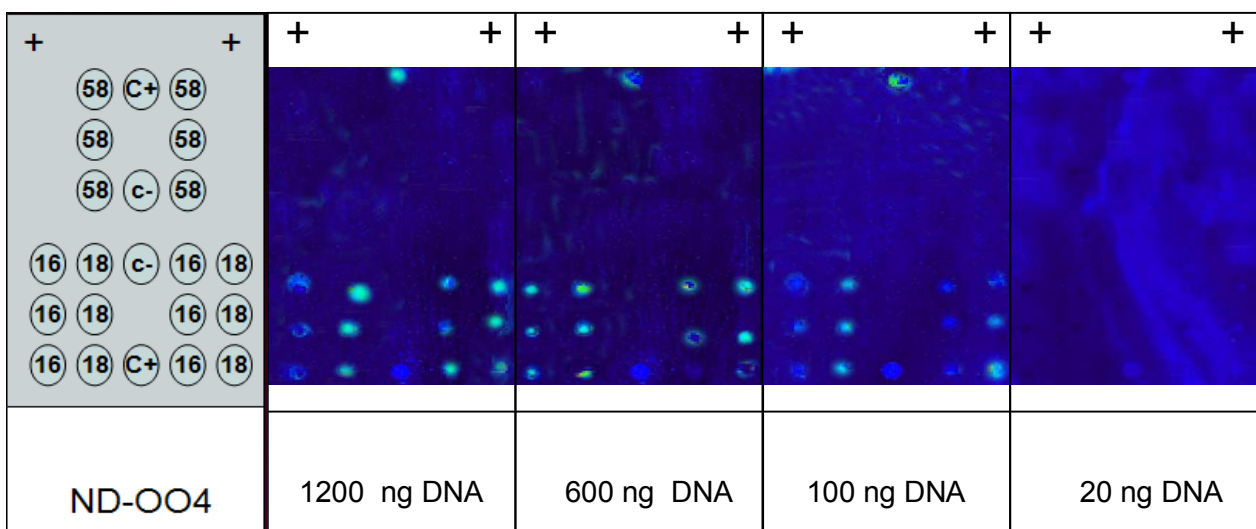
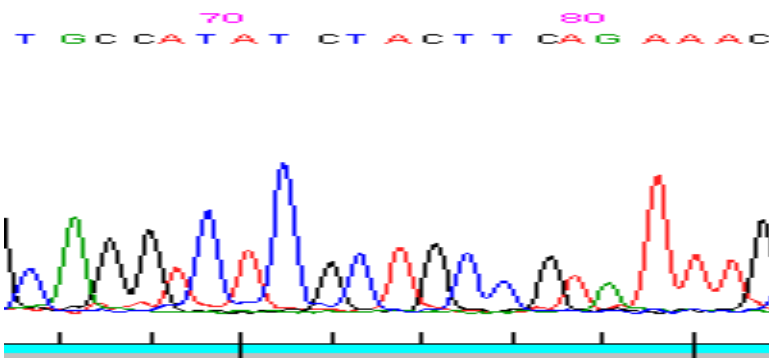
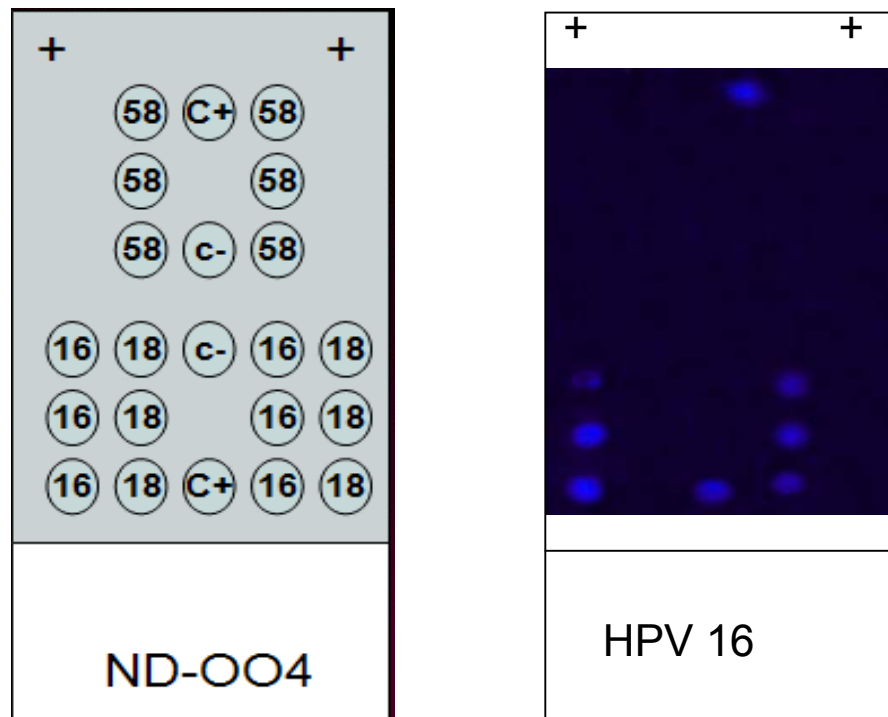


Figura 50. Detección y tipificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16 y 18 amplificados a partir de muestras clínicas con CC sobre los Biochips de DNA. En A y B se muestra la hibridación de amplificados obtenidos a partir de diferentes concentraciones de DNA genómico proveniente de las muestras clínicas MC-1 y MC-2.



→ 5' GTTTCTGAAGTAGATATGGCA

Figura 51. Validación del Biochip de DNA en la detección y tipificación del VPH 16 mediante la hibridación de amplificados provenientes de muestras clínicas con CC. Se muestra las señales de hibridación obtenidas a partir del reconocimiento específico entre fragmentos del gen L1 del VPH 16 y las sondas inmovilizadas sobre la superficie del Biochip de DNA, con la respectiva secuencia del producto de PCR.

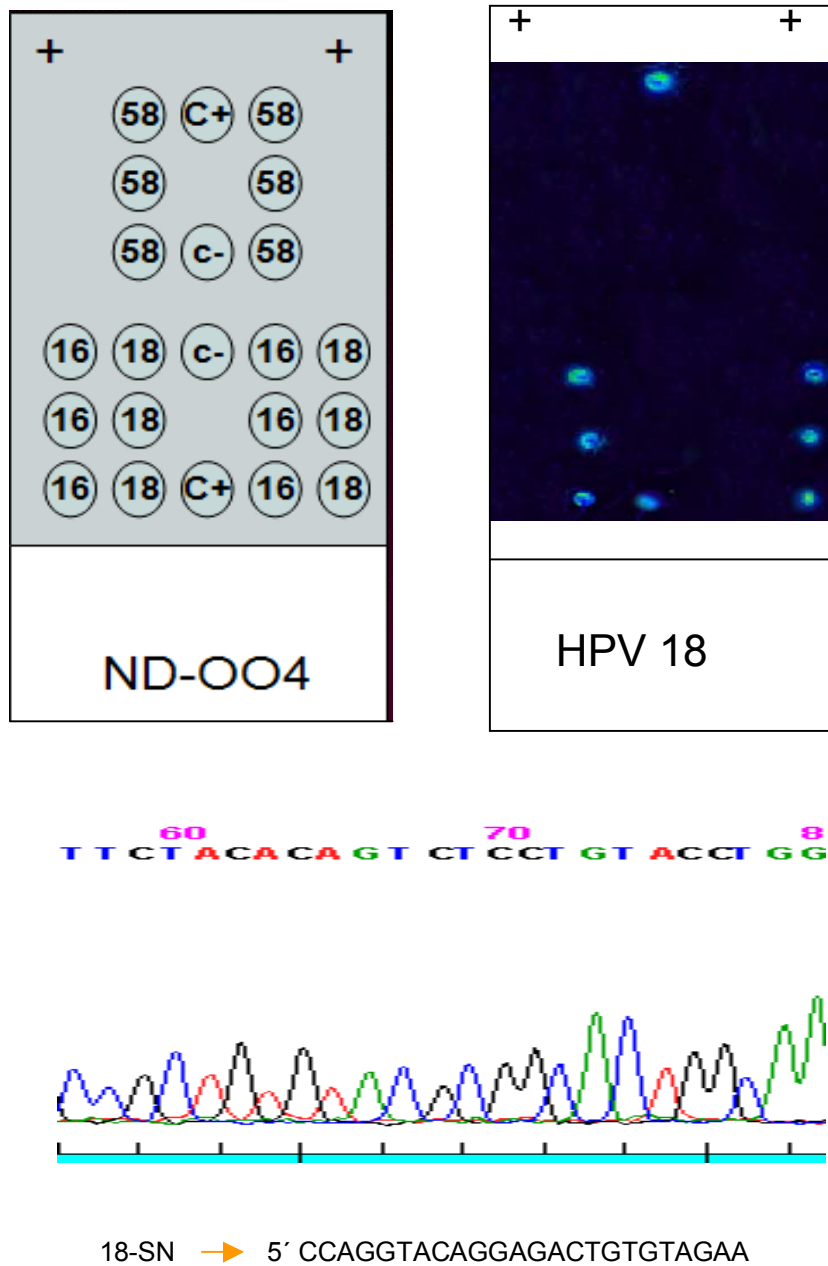
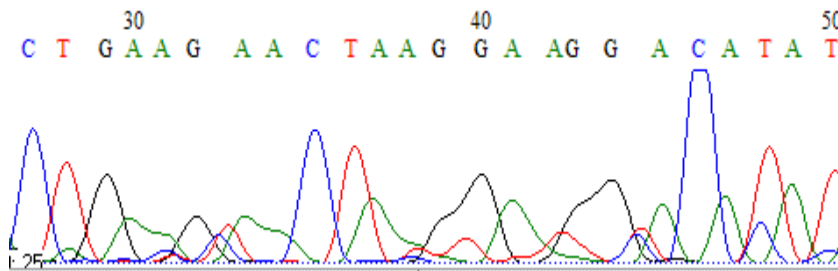
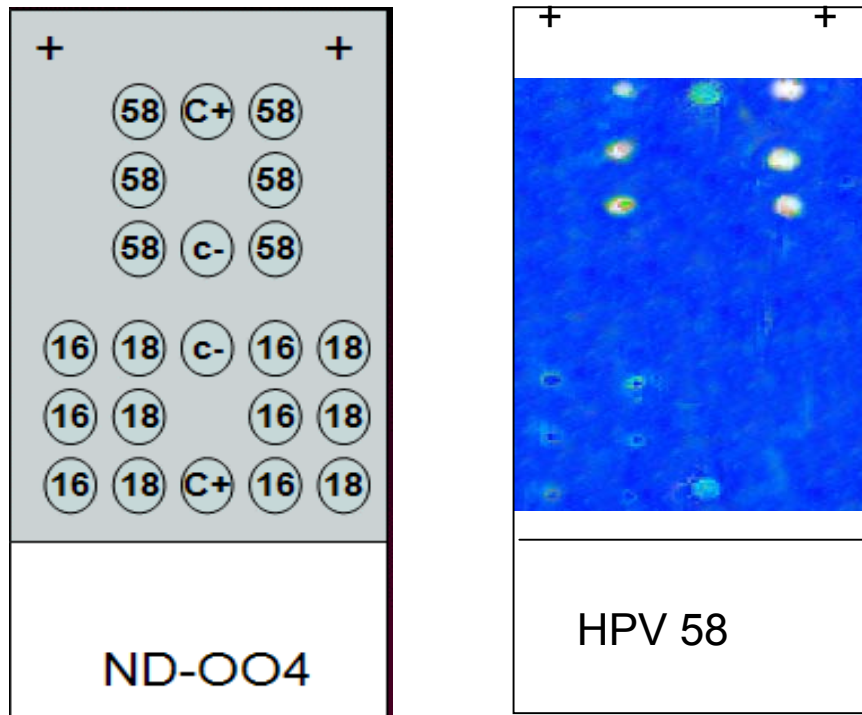


Figura 52. Validación del Biochip de DNA en la detección y tipificación del VPH 18 mediante la hibridación de amplificados provenientes de muestras clínicas con CC. Se muestra las señales de hibridación obtenidas a partir del reconocimiento específico entre fragmentos del gen L1 del VPH 18 y las sondas inmovilizadas sobre la superficie del Biochip de DNA, con la respectiva secuencia del producto de PCR.



58-SN → 5' GTACCTTCCTTAGTACTTCA

Figura 53. Validación del Biochip de DNA en la detección y tipificación del VPH 58 mediante la hibridación de amplificadas provenientes de muestras clínicas con CC. Se muestra las señales de hibridación obtenidas a partir del reconocimiento específico entre fragmentos del gen L1 del VPH 58 y las sondas inmovilizadas sobre la superficie del Biochip de DNA, con la respectiva secuencia del producto de PCR.

## 9.0 CONCLUSIONES

- Se diseñó un Biochip de DNA dirigido a la detección de los VPH de alto riesgo 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 sobre la base del reconocimiento específico de fragmentos del gen L1. En esta etapa, la aplicación de diversas herramientas bioinformáticas especializadas en el análisis de secuencias de ácidos nucleicos facilitó la selección de una serie de oligonucleótidos (sondas, DNA blanco, oligonucleótidos estabilizadores, secuencias reporteras, iniciadores) que en ensayos de hibridación virtual garantizaron la detección específica de los VPH de interés.
- De acuerdo con su accesibilidad, la estandarización y validación del Biochip de DNA se realizó a partir de los VPH 16, 18 y 58, identificados en más del 90 % del total de las infecciones.
- Durante el proceso de estandarización, el uso de pequeños oligonucleótidos que simulaban la región de interés en el gen L1 reveló una alta sensibilidad y especificidad del Biochip de DNA en la detección y tipificación de los VPH 16, 18 y 58.
- La funcionalidad del Biochip de DNA en la detección y tipificación de VPH de alto riesgo fue confirmada en amplificadores obtenidos a partir de las líneas celulares CaSki y SiHa, de un DNA positivo para VPH 18 y de muestras clínicas con CC, donde infecciones simples e infecciones con más de uno de los VPH 16, 18 y 58 fueron identificadas.
- La frecuencia de infecciones con más de un tipo de VPH de alto riesgo en las muestras clínicas con CC analizadas sobre los Biochips de DNA fue superior a la reportada previamente mediante la aplicación de diversas estrategias de detección molecular.
- Este Biochip de DNA resultó ser una herramienta molecular fácil de realizar, rápida, eficaz y de bajo costo que permitió detectar y tipificar a un grupo de VPH de alto riesgo de manera sensible y con una alta especificidad, propiedades que lo colocan como una interesante alternativa en el diagnóstico clínico al hacer factible su aplicación en investigación y en los sistemas de salud.

- Aunque ya existen reportes de Biochips de DNA dirigidos a la identificación de VPH con una sensibilidad comparable a la que ofrece otros sistemas de detección bien establecidos como la Captura de Híbridos II, su baja especificidad, el equipo tan sofisticado que requiere su implementación y el elevado costo que representa el procesamiento de la muestra disminuyen la viabilidad de su aplicación. En cambio, la estrategia que aplicamos a la detección y tipificación viral sobre Biochips de DNA mostró altos niveles de sensibilidad y de especificidad mediante ensayos relativamente simples y con ayuda de equipo técnico actualmente disponible en la mayoría de los laboratorios clínicos y de investigación.
- La prevención y control de las enfermedades debería ser una prioridad en los servicios de salud. El CC es considerado un gran problema de salud pública que generalmente afecta a mujeres de bajos recursos y que de no ser detectado y tratado en sus etapas iniciales, casi siempre es mortal. Sería de gran utilidad poder realizar un tamizaje que incluyera la detección molecular de VPH de alto riesgo en sistemas de alto rendimiento como los Biochips de DNA a la par de otras estrategias diagnósticas primarias como la colposcopia o el papanicolaou, esto incrementaría la posibilidad de detectar y tratar oportunamente mujeres con lesiones precancerosas, identificar aquellas que requieran tratamientos más agresivos o aquellas que necesiten ser monitoreadas con mayor frecuencia, estos aspectos podrían contribuir a disminuir la incidencia de CC y mejorar la calidad de vida de las mujeres afectadas.

## 10.0 LISTA DE FIGURAS

	página
<b>Figura 1.</b> Genoma del virus de papiloma humano VPH.	9
<b>Figura 2.</b> Relación entre prevalencia del virus de papiloma humano (VPH) e incidencia de cáncer cervical (CC) según la edad.	10
<b>Figura 3.</b> Etapas fundamentales durante el desarrollo de los Biochips.	18
<b>Figura 4.</b> Elementos importantes durante el diseño y la fabricación de los Biochips.	19
<b>Figura 5.</b> Principales etapas durante el desarrollo de fármacos.	27
<b>Figura 6.</b> Diferentes fases dentro del proceso de desarrollo de fármacos.	27
<b>Figura 7.</b> Aplicaciones de la farmacogenética y la farmacogenómica en la salud humana.	28
<b>Figura 8.</b> Aplicación de los Biochips de DNA en la investigación básica.	29
<b>Figura 9.</b> Principales aplicaciones de los Biochips de DNA en la Microbiología clínica	30
<b>Figura 10.</b> Aplicación de los Biochips de DNA en el diagnóstico molecular del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) asociado a enfermedades infecciosas como el Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida (SIDA).	31
<b>Figura 11.</b> Patrón de inmovilización de las sondas utilizadas en la validación del Biochip de DNA dirigido a la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC.	44
<b>Figura 12.</b> Estrategia general para el desarrollo del Biochip de DNA dirigido a la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC.	50
<b>Figura 13.</b> Alineamiento global del genoma de los VPH de alto riesgo por ClustalW (versión 1.83).	54
<b>Figura 14.</b> Regiones en el gen L1 que más han sido utilizadas en el diagnóstico molecular de los VPH.	59
<b>Figura 15.</b> Alineamiento del gen L1 de los VPH de alto riesgo mediante el programa T-Coffee.	60
<b>Figura 16.</b> Estrategia de detección de VPH sobre Biochips de DNA.	64
<b>Figura 17.</b> Evaluación de auto-homología de las sondas propuestas para la identificación molecular de los VPH 16, 18, 31 y 33 según el Self-dimer del programa Oligo Analyzer Versión 3.0.	68
<b>Figura 18.</b> Evaluación de auto-homología de las sondas propuestas para la identificación molecular de los VPH 35, 45, 52 y 58 según el Self-dimer del programa Oligo Analyzer Versión 3.0.	69
<b>Figura 19.</b> Evaluación "in silico" de la especificidad de la sonda 16-SN frente a su secuencia complementaria HPV16_L1ref y otras secuencias virales no complementarias HPV18_L1ref y HPV31_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del Oligo Analyzer Versión 3.0.	74
<b>Figura 20.</b> Evaluación "in silico" de la especificidad de la sonda 16-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV33_L1ref, HPV35_L1ref y HPV45_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del Oligo Analyzer Versión 3.0.	75
<b>Figura 21.</b> Evaluación "in silico" de la especificidad de la sonda 16-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV52_L1ref y HPV58_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del Oligo Analyzer Versión 3.0.	76
<b>Figura 22.</b> Evaluación "in silico" de la especificidad de la sonda 18-SN frente a su secuencia complementaria HPV18_L1ref y otras secuencias virales no complementarias HPV16_L1ref y HPV31_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del Oligo Analyzer Versión 3.0.	77
<b>Figura 23.</b> Evaluación "in silico" de la especificidad de la sonda 18-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV33_L1ref, HPV35_L1ref y HPV45_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del Oligo Analyzer Versión 3.0.	78
<b>Figura 24.</b> Evaluación "in silico" de la especificidad de la sonda 18-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV52_L1ref y HPV58_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del Oligo Analyzer Versión 3.0.	79
<b>Figura 25.</b> Evaluación "in silico" de la especificidad de la sonda 58-SN frente a su secuencia complementaria HPV58_L1ref y otras secuencias virales no complementarias HPV16_L1ref y HPV18_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del Oligo Analyzer Versión 3.0.	80
<b>Figura 26.</b> Evaluación "in silico" de la especificidad de la sonda 58-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV31_L1ref, HPV33_L1ref y HPV35_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del Oligo Analyzer Versión 3.0.	81
<b>Figura 27.</b> Evaluación "in silico" de la especificidad de la sonda 58-SN frente a otras secuencias virales no complementarias como HPV45_L1ref y HPV52_L1ref calculada a partir del Hetero-Dimer, un subprograma del Oligo Analyzer Versión 3.0.	82
<b>Figura 28.</b> Reconocimiento específico de la sonda 16-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 16 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	83
<b>Figura 29.</b> Reconocimiento específico de la sonda 18-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 18 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	84
<b>Figura 30.</b> Reconocimiento específico de la sonda 31-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 31 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	85
<b>Figura 31.</b> Reconocimiento específico de la sonda 33-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 33 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	86
<b>Figura 32.</b> Reconocimiento específico de la sonda 35-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 35 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	87
<b>Figura 30.</b> Reconocimiento específico de la sonda 31-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 31 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	85
<b>Figura 31.</b> Reconocimiento específico de la sonda 33-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 33 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	86
<b>Figura 32.</b> Reconocimiento específico de la sonda 35-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 35 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	87

<b>Figura 33.</b>	Reconocimiento específico de la sonda 45-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 45 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	88
<b>Figura 34.</b>	Reconocimiento específico de la sonda 52-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 52 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	89
<b>Figura 35.</b>	Reconocimiento específico de la sonda 58-SN por secuencias presentes en el genoma del VPH 58 según la base de datos del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).	90
<b>Figura 36.</b>	Diseño general del Biochip de DNA para la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC.	91
<b>Figura 37.</b>	Reconocimiento específico entre el DNA blanco viral (sintético -DNAbs-L1/16, DNAb-L1/18, DNAb-L1/58- y tumoral -PCR-1), los oligonucleótidos estabilizadores (ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58) y el REP/UNI-Cy3 según el programa Oligo Analyzer Versión 3.0.	94
<b>Figura 38.</b>	Hibridación del producto de amplificación del gen de la $\beta$ -Globina sobre los Biochips de DNA.	96
<b>Figura 39.</b>	Hibridación de los oligonucleótidos usados como DNA blanco del VPH 16 (DNAb-L1/16), su oligonucleótido estabilizador ONEST/16 y el REP/UNI-Cy3 sobre los Biochips de DNA.	101
<b>Figura 40.</b>	Hibridación de los oligonucleótidos usados como DNA blanco del VPH 18 (DNAb-L1/18), su oligonucleótido estabilizador ONEST/18 y el REP/UNI-Cy3 sobre los Biochips de DNA.	102
<b>Figura 41.</b>	Hibridación de los oligonucleótidos usados como DNA blanco del VPH 58 (DNAb-L1/58), su oligonucleótido estabilizador ONEST/58 y el REP/UNI-Cy3 sobre los Biochips de DNA.	103
<b>Figura 42.</b>	Hibridación simultánea de los oligonucleótidos usados como DNA blanco de los VPH 16, 18 y 58 (DNAb-L1/16, DNAb-L1/18 y DNAb-L1/58), sus respectivos oligonucleótidos estabilizadores ONEST/16, ONEST/18 y ONEST/58 y el REP/UNI-Cv3 sobre los Biochips de DNA.	104
<b>Figura 43.</b>	Amplificación por PCR de fragmentos del gen L1 de los VPH 16 y 18 a partir de las líneas celulares CaSki y SiHa y de un DNA de VPH 18 clonado en el vector pUC18 modificando la temperatura de alineamiento de los iniciadores.	106
<b>Figura 44.</b>	Amplificación por PCR de fragmentos específicos del gen L1 a partir de diferentes concentraciones de DNA genómico proveniente de las líneas celulares CaSki y SiHa positivas para VPH 16 y de un DNA positivo para VPH 18.	109
<b>Figura 45.</b>	Amplificación específica de fragmentos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 a partir de DNA genómico proveniente de pacientes con CC.	111
<b>Figura 46.</b>	Diferencias registradas en los niveles de amplificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 obtenidos a partir de muestras clínicas con CC.	113
<b>Figura 47.</b>	Amplificación de fragmentos específicos del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 a partir de diferentes concentraciones de DNA genómico proveniente de dos muestras clínicas con CC.	114
<b>Figura 48.</b>	Síntesis cíclica de fragmentos de amplificación del gen L1 de los VPH 16, 18 y 58 obtenidos a partir de diferentes concentraciones de DNA genómico de líneas celulares y muestras clínicas con CC.	115
<b>Figura 49.</b>	Detección y tipificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16 y 18 obtenidos a partir de las líneas celulares CaSki, SiHa y un DNA positivo para VPH 18 sobre los Biochips de DNA.	118
<b>Figura 50.</b>	Detección y tipificación de fragmentos del gen L1 de los VPH 16 y 18 amplificados a partir de muestras clínicas con CC sobre los Biochips de DNA.	122
<b>Figura 51.</b>	Validación del Biochip de DNA en la detección y tipificación del VPH 16 mediante la hibridación de amplificados provenientes de muestras clínicas con CC.	123
<b>Figura 52.</b>	Validación del Biochip de DNA en la detección y tipificación del VPH 18 mediante la hibridación de amplificados provenientes de muestras clínicas con CC.	124
<b>Figura 53.</b>	Validación del Biochip de DNA en la detección y tipificación del VPH 58 mediante la hibridación de amplificados provenientes de muestras clínicas con CC.	125



## 11.0 LISTA DE TABLAS

	<b>página</b>
<b>Tabla 1.</b> Virus de papiloma humano (VPH) frecuentemente asociados con LGSIL, HGSIL y CC.	7
<b>Tabla 2.</b> Tipos de VPH frecuentemente identificados en CC a nivel mundial según la IARC.	11
<b>Tabla 3.</b> Tipos de soportes para Biochips de DNA: ventajas y desventajas.	21
<b>Tabla 4.</b> Clasificación de los Biochips de DNA.	22
<b>Tabla 5.</b> Principales tecnologías empleadas en la fabricación de los Biochips de DNA.	25
<b>Tabla 6.</b> Técnicas de detección de la hibridación sobre los Biochips de DNA	24
<b>Tabla 7.</b> Aplicaciones de los Biochips de DNA en la salud humana	26
<b>Tabla 8.</b> Iniciadores usados en la amplificación por PCR de fragmentos específicos del gen L1 de VPH de alto riesgo.	41
<b>Tabla 9.</b> Sondas propuestas para la detección molecular de VPH de alto riesgo en CC mediante Biochips de DNA.	43
<b>Tabla 10.</b> Oligonucleótidos usados como DNA blanco o secuencia de referencia de los VPH 16, 18 y 58 durante el proceso de estandarización del Biochip de DNA.	45
<b>Tabla 11.</b> Oligonucleótidos estabilizadores y secuencias reporteras Cy3 usadas para detectar señales de hibridación viral sobre la superficie de los Biochips de DNA.	46
<b>Tabla 12.</b> Solución de hibridación en cloruro de tetrametil amonio (TMAC).	48
<b>Tabla 13.</b> Solución de hibridación en solución citrato salina (SSC).	48
<b>Tabla 14.</b> VPH de alto riesgo considerados en el diseño del Biochip de DNA.	52
<b>Tabla 15.</b> Condiciones de hibridación de los oligonucleótidos usados DNA blanco viral sobre los Biochips de DNA.	100
<b>Tabla 16.</b> Frecuencia de VPH de alto riesgo identificados sobre los Biochips de DNA.	119

## 12.0 LISTA DE ABREVIATURAS

16-SN, 18-SN, 31-SN, 33-SN, 35-SN, 45-SN, 52-SN, 58-SN	Sondas de DNA dirigidas a la detección y tipificación de VPH de alto riesgo
AA, E, NA, Af, As	Variantes de VPH 16
ASCUS	Atypical Scamous Cells of Undetermined Significance
C-	Control negativo
C+	Control positivo
CC	Cáncer Cervical
cDNA	DNA complementario, sintetizado a partir de mRNA
ClustalW, T-Coffee, BLAST	Herramientas bioinformáticas especializadas en el alineamiento simultáneo de dos o más secuencias genéticas
ΔG°	Cambio de energía libre de Gibbs (en condiciones estándar)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAbs-L1/16, DNAbs-L1/18, DNAbs-L1/58	Moléculas sintéticas de DNA que simularon fragmentos específicos del gen L1 de VPH de alto riesgo
E6, E1, E2, E4, E5, E7,	Genes virales de expresión temprana
FDA	Food and Drug Administration
H	Horas
HC, HC2, HC3	Captura de Híbridos (primera, segunda y tercera generación)
HGSIL	High Grade Squamous Intraepithelial Lesion
HPV16_L1REF, HPV18_L1REF, HPV31_L1REF, HPV33_L1REF, HPV35_L1REF, HPV45_L1REF, HPV52_L1REF, HPV58_L1REF	Fragmentos de DNA del Gen L1 cuya secuencia corresponde al genoma de referencia de l
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICTV	International Council of Taxonomy of Viruses
ISH	Hibridación <i>In Situ</i>
L1, L2	Genes virales de expresión tardía
L1-16f, L1-16r, L1-18f, L1-18r, L1-58f, L1-58r	Iniciadores de PCR
LCR	Long Control Region
LGSIL	Low Grade Squamous Intraepithelial Lesion
μL	microlitros
mRNA	RNA mensajero
MC-1, MC-2	Muestras clínicas con CC
ng	nanogramos
nt	nucleótidos
ONEST/16, ONEST/18, ONEST/58	Oligonucleótidos estabilizadores
ORF	Open Reading Frames
pb	pares de bases
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PCR-1, PCR-2	PCR bajo diferentes condiciones experimentales
pmol	picomoles
PMP	Marcador de peso molecular
PNAs	Ácidos nucleicos peptídicos
PV	Papilomavirus
REP/UNI-Cy3	Molécula sintética de DNA marcada con el fluoróforo Cy3
RNA	Ácido Ribonucleico
SSC	Solución Citrato Salina
Temp °C	Temperatura
Tm	Temperatura de desnaturalización o de fusión
TMAC	Cloruro de Tetrametil Amonio
VPH	Virus de Papiloma Humano

### 13.0 REFERENCIAS

1. Cervical cancer screening in developing countries: Report of a WHO consultation. World Health Organization 2002. Geneva, Switzerland.
2. Documentos de consenso: La infección por papilomavirus. Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia S.E.G.O. 2002. España.
3. IARC Working Group. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Human papillomaviruses. Lyon: IARC Scientific Publication: 1995.
4. Bosh FX, Muñoz N, Shah KV and Meheus A. 1992. Second International Workshop on the epidemiology of cervical cancer and human papillomavirus. *Int J Cancer*. 52: 171-173.
5. Bosh FX. 2003. Epidemiology of human papillomavirus infections: new options for cervical cancer preventions. *SPM* 45(3): S326-S339.
6. Shiffman P and P Castle. 2003. Epidemiologic studies of a necessary causal risk factor: human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 95(6): ppE2.
7. Wallboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-9.
8. Baseman JG and LA Koutsky. 2005. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol* 32S: S16-S24.
9. Burd EM. 2003. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clin Microbiol, Reviews* 16(1):1-17.
10. Bosh FX and de San Jose S. 2003. Chapter 1: human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 31: 3-13.
11. Muñoz N, Bosh FX, de San Jose S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. 2003. Epidemiological classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 348: 518-527.
12. Steenbergen RD, Wilde J, Wilting SM, Brink AATP, Snidjers PJF and CJLM Meijer. 2005. HPV-mediated transformation of the anogenital tract. *J Clin Virol* 32S: S25-33.
13. Sterling JC. Human papillomaviruses and skin cancer. *J Clin Virol* 32S: S67-S71.
14. Syrjänen S. 2005. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 32S: S59-S66.
15. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU and zur Hausen H. 2004. Classification of human papillomavirus. *Virology* 324: 17-27.
16. Bernard HU. 2005. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* 32S: S1-S6.
17. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. 2006. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 118: 1071-1076.
18. Doorbar J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32S: S7-S15.
19. Molijn A, Kleter B, Quint W and van Doorn LJ. 2005. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol* 32S: S43-S51.

20. Burk, R. 1999. Human papillomavirus and the risk of cervical cancer. pp. 103-111.
21. Muñoz N, Bosh X, Castellsague X, Díaz M, de San Jose S, Hammouda D Shah KV and CJLM Meijer. 2004. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*. 111, 278-285.
22. Longworth MS and LA Laimins. 2004. Pathogenesis of the human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol and Mol Biol Rev*. 68(2): 362-372.
23. Clifford GM, Smith JS, Plummer M, Muñoz N and S Franceschi. 2003. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis. *British J Cancer* 88: 63-73.
24. Parkin DM, Bray F, Ferlay J and P Pisani. 2001. Estimating the world cancer burden: GLOBOCAN 2000. *Int J Cancer* 94: 153-156.
25. Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM. *Globocan 2000: cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, versión 1.0*. IARC CancerBase no.5 Lyons, France: IARC press, 2001.
26. Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Daniel R, Ghaffari A, Solorza G and K Shah. 1998. HPV prevalence among mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 70: 115-120.
27. Hernández-Hernández DM, Ornelas-Bernal, L, Guido. Jiménez M, Apresa-Gracia T, Alvarado-Cabrero I, Salcedo-Vargas M, Mohar-Betancourt A and A García-Carranca. Association between high-risk human papillomavirus DNA load and precursor lesions of cervical cancer in mexican women. *Gynecol Oncol* 90: 310-317.
28. Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodríguez AC, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ and RD Burk. 2001. Human papillomavirus type 16 variants and risk of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 93(4):315-317.
29. Bernard HU, Calleja-Macias I, Terence DS. 2005. Genome variation of human papillomavirus types: Phylogenetic and medical implications. *Int J Cancer* 118: 1071-1076.
30. Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano E, Salmeron S, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, García-Carranca A, González-Lira G and A Madrigal-de la Campa. 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Nat Cancer Inst* 93(17): 1325-1330.
31. Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, Lopez N, Guido M and J Berumen. 1999. Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 83: 499-455.
32. González-Losa MR, Mier y Teran MAL, Puerto-Solís, M and A García-Carranca. 2004. Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *J Clin Virol* 29:95-98.
33. Cuschieri KS and HA Cubie. 2005. The role of human papillomavirus testing in cervical screening. *J Clin Virol* 32S: S34-S42.

34. Lee KJ, Lee JK and HS Saw. 2004. Can human papillomavirus DNA testing substitute for cytology in the detection of high grade cervical lesion? Arch Pathol Lab Med 128: 298-302.
35. Hubbard RA. 2003. Human papillomavirus testing methods. Arch Pathol Lab Med 127: 940-945.
36. Lorincz AT. 1996. Hybrid capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens: a tool for clinical management of equivocal Pap smears and for population screening. J Obstet Gynecol Res 22: 629-36.
37. Iftner T and L Villa. 2003. Chapter 12: Human papillomavirus Technologies. J Natl Cancer Inst Monographs. 31: 80-88.
38. Lorincz AT. 2003. Screening for cervical cancer: new alternatives and research. SPM 45(3): S376-S387.
39. Castle PE, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, Rush BB, Wacholder S, Burk RD, Manos M, Schussler JE, Macomber P, Schiffman M. 2003. Comparison between prototype Hybrid Capture 3 and Hybrid Capture 2 human papillomavirus DNA assays for detection of high-grade cervical intraepithelial neoplasia and cancer. J Clin Microbiol 41(9): 4022-4030.
40. Sotlar, K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton m, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R and B Bultman. 2004. Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. J Clin Microbiol 42(7): 3176-3184.
41. Kleter B, van Dorn LJ, Schegget J, Schrauwen L, Krimpen K, Burger M, Harmsel B and W Quint. 1998. Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive Broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. Am J Pathol 153(6): 1731-1739.
42. Microarrays y Biochips de ADN. Informe vigilancia tecnológica. 2002. GENOMA ESPAÑA/CIBT-FGUAM. GEN-ESO2001.
43. Aplicaciones de los Microarrays y Biochips en salud humana. Informe de vigilancia tecnológica. 2005. GENOMA ESPAÑA/CIBT-FGUAM. GEN-ESO6001.
44. Brown PO and D Botstein. 1999. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. Nat Genet. 21(1 Suppl):33-7.
45. Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R and G Childs. 1999. Making and reading microarrays. Nature Genetics. 21:15-19.
46. Doménech-Sánchez A, and J Vila. 2004. Fundamentos, tipos y aplicaciones de los arrays de DNA en la microbiología médica. Enferm Infecc Microbiol Clin 22(1): 46-54.
47. Moreno V and X Solé. 2004. Uso de Chips de DNA (microarrays) en medicina: fundamentos técnicos y procedimientos básicos para el análisis estadístico de resultados. Med Clin (Barc) 122(1): 73-9.
48. Schena MD, Shalon R, Davis W and PO Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA Microarray. Science. 270: 467-70.
49. Schena M, Heller RA, Theriault TP, Konrad K, Lachenmeier E and RW Davis. 1998. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics. TIB Technology. 16: 301-306.

50. Bachman J and M Pluskal. 2004. Advancing applications of microarrays. *Drug Discovery Today*. 9(2): 61-63.
51. Campas M and I Katakis. 2004. DNA biochips arraying, detection and amplification strategies. *Trends in Analytical Chemistry*. 23(1): 49-62.
52. Blohm DH and A Guiseppi-Elie. 2001. New developments in microarray technology. *Current Opinion in Biotechnology*. 12: 41–47.
53. Shieh B and C Li. 2004. Multifaced, multi-versatile microarray: simultaneous detection of many viruses and their expression profiles. *Retrovirology*. 1:11.
54. Saslow D, Runowicz CD, Solomon D, Mooscicki AB, Smith RA, Eyre HJ and C Cohen. 2002. American Cancer Society Guideline for the Early Detection of Cervical Neoplasia and Cancer. *Ca Cancer J Clin* 52: 342-362.
55. Manos MM, Kynney WK, Hurley LB, Sherman ME, Shieh-Ngai J, Sherman RJ, Ramsey JE, Fetterman BJ, Hartinger JS, McIntosh KM, Pawlik GF and RA Hiatt. 1999. Identifying women with cervical neoplasia: using human papillomavirus DNA testing for equivocal Papanicolaou results. *JAMA* 281:1605-1610.
56. Solomon D, Schiffman M and R Tarone. 2001. Comparison of three management strategies for patients with atypical squamous cells of undetermined significance. Baseline results from a randomized trial. *J Natl Cancer Inst*. 93:293-299.
57. Doorbar J. 2005. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol* 32S: S7-S15.
58. Kim CJ, Jeong JK, Park M, Park TS, Park TC, Namkoong SE and JS Park. 2003. HPV oligonucleotide microarray-based detection of HPV genotypes in cervical neoplastic lesions. *Gynecol Oncol* 89:210-217.
59. Cho NH, An HJ, Jeong JK, Kang S, Kim JW, Kim YT, and TK Park. 2003. Genotyping of 22 human papillomavirus types by DNA Chip in Korean women: Comparison with cytologic diagnosis. *Am J Obstet Gynecol* 188: 56-62.
60. An HJ, Cho NH, Lee SY, Kim SJ, Mun MS, Kim SH and JK Jeong. 2003. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA Chip Microarray Method. *Cancer* 97: 1672-80.
61. Choi BS, Kim O, Park MS, Kim KS, Jeong JK and JS Lee. 2003. Genital human papillomavirus genotyping by HPV Oligonucleotide Microarray in Korean commercial sex workers. *J Med Virol* 71: 440-445.
62. Liu CH, Ma WL, Shi R, Ou YO, Zhang B and WL Zheng. 2003. Possibility of using DNA chip technology for diagnosis of human papillomavirus. *J Biochem Mol Biol* 36(4): 349-53.
63. Hwang TS, Jeong JK, Park M, Han HS, Choi HK and Tae Shin Park. 2003. Detection and tipification of HPV genotypes in various cervical lesions by HPV oligonucleotide microarray. *Gynecol Oncol*. 90: 51-56.
64. Park TC, Kim CJ, Koh YM, Lee KH, Yoon JH, Kim JH, Namkoong SE and JS Park. 2004. Human papillomavirus genotyping by the DNA Chip in the cervical neoplasia. *DNA and Cell Biol* 23(2): 119-125.
65. Hwang HS, Park M, Lee SY, Kwon KH and MG Pang. 2004. Distribution and prevalence of human papillomavirus genotypes in routine Pap smear of 2470 Korean women determined by DNA Chip. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(12): 2153-2156.

66. Oh TJ, Kim CJ, Woo SK, Kim TS, Jeong DJ, Kim MS, Lee S, Cho HS and S An. 2004. Development and clinical evaluation of a highly sensitive DNA Microarray for detection and genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 42(7): 3272-3280.
67. Klaassen CHW, Prinsen CFM, de Valk HA, Horrevorts AM, Jeunink MAF and FBJM Thunnissen. 2004. DNA Microarray format for detection and subtyping of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 42(5): 2152-2160.
68. Albrecht V, Chevallier A, Magnone V, Barbry P, Vandenbos F, Bongain A, Lefebvre JC and V Giordanengo. 2006. Easy and fast detection and genotyping of high-risk human papillomavirus by dedicated DNA Microarrays. *J Viral Methods*, in press.
69. Vernon SD, Farkas DH, Unger ER, Chan V, Miller DL, Chen YP, Blackburn GF and WC Reeves. Bioelectronic DNA detection of human papillomaviruses using eSensorTM: a model system for detection of multiple pathogens. *BMC Infect Diseases* 3(12): 1-9.
70. Germignani F, Landi S, Chabrier A, Smet A, Zehbe I, Canzian F and M Tommasino. 2004. Generation of a DNA Microarray for determination of E6 natural variants of human papillomavirus type 16. *J Virologic Methods* 119: 95-102.
71. Shim C, Zhahng W, Rhee CH and JH Lee. 1998. Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res* 4: 3045-3050.
72. Duffy CL, Phillips SL and AJ Klingelutz. 2003. Microarray analysis identifies differentiation-associated genes regulated by human papillomavirus type 16 E6. *Virology* 314: 196-205
73. Hudelist G, czerwenka K, Singer C, Pischinger K, Kubista E and M Manavi. 2005. cDNA arrays analysis of cytobrush-collected normal and malignant cervical epithelial cells: a feasibility study. *Cancer Genet and Citogenet* 158: 35-42.
74. Ahn WS, Bae SM, Lee JM, Namkoong SE, Han SJ, Cho YL, Nam GH, Seo JS, Kim CK and YW Kim. 2004. Searching for pathogenic gene function to cervical cancer. *Gynecol Oncol* 93: 41-48.
75. Cheung VG, Morley M, Aguilar F, Massimi A, Kucherlapati R and G Chils. 1999. Making and reading microarrays. *Nat Genet Suppl.* 21; 15-19.
76. Beattie KL, Eggers MD, Shumaker JM, Hogan ME, Varma RS, Lamture JB, Hollis M, Ehrlich D and D Rathman. 1993. Genosensor technology. *Clin Chem.* 39: 719-722.
77. Beattie WG, Meng L, Turner S, Varma RS, Dao DD, and KL Beattie. 1995. Hybridization of DNA targets to glass-tethered oligonucleotide probes. *Mol Biotechnol.* 4: 213-225.
78. Peyton CL, Schiffman M, Lorincz AT, Hunt WC, Mielzynska I, Bratti C, Eaton S, Hildesheim A, Morera LA, Rodríguez AC, Herrero R, Sherman ME and CM Wheeler. 1998. Comparison of PCR and Hybrid Capture Based human papillomavirus detection systems using multiple cervical specimen collection strategies. *J Clin Microbiol* 36(11): 3248-3254.
79. Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ and CM Wheeler. 1998. Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-

- hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol.* 36(10): 3020-3027.
80. Emmeny RT, Herron JR, Xi LF, Koutsky LA, Kiviat NB and CM Wheeler. 1999. Comparison of variant-specific hybridization and single-strand conformational polymorphism methods for detection of mixed human papillomavirus type 16 variant infection. *J clin microbiol.* 37(11): 3627-3633.
81. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR and RJ Apple. 2000. Improved amplification of genital human papillomavirus. *J Clin Microbiol.* 38(1): 357-361.
82. Eriksson A, Herron JR, Yamada T and CM Wheeler. 1999. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol.* 80: 595-600.
83. zur Hausen H. 2002. papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev.* 2: 342-350.
84. Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL and A García Carranca. Genome amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer.* 56: 640-645.
85. Berumen J, Unger E, Casas I and P Figueroa. 1995. Amplification of human papillomavirus types 16 y 18 in invasive cervical cancer. *Human Pathol.* 26(6): 676-681.
86. Jacobs MV, Snidjers PJ, van den Brule AJ, Helmerhorst TJ, Meijer CJ and JM Walboomers. 1997. A general primers GP5+/GP6+-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol.* 35:791-795.
87. Chan SY, Delius H, Halpern AL and HU Bernard. 1995. Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny and taxonomy. *J Virol.* 69:3074-3083.
88. Maldonado-Rodríguez R, Beattie KL. 2001. Analysis of nucleic acids by tandem hybridization on oligonucleotide microarrays. *Methods Mol Biol.* 170:157-171.
89. Maldonado-Rodríguez R, Espinosa-Lara M, Barrera-Leon O, Colin-Tovar C, Gonzalez-Yebra B, Salcedo-Vargas M, Santiago-Hernandez JC, Mendez-Tenorio A, Beattie KL. 2003. Detection of RET proto-oncogene codon 634 mutations using double tandem hybridization. *Mol Biotechnol.* 25:113-129.
90. Maldonado-Rodríguez R, Espinosa-Lara M, Calixto-Suarez A, Beattie WG and KL Beattie. 1999. Hybridization of glass-tethered oligonucleotide probes to target strand preannealed with labeled auxiliary oligonucleotides. *Mol Biotechnol.* 11:1-12.
91. Maldonado-Rodríguez R, Espinosa-Lara M, Loyola-Abitia P, Beattie GW and KL Beattie. 1999. Mutation detection by stacking hybridization on genosensor arrays. *Mol Biotechnol.* 11: 13-25.
92. Rangel-López A, Maldonado-Rodríguez R, Salcedo-Vargas M, Espinosa-Lara JM, Méndez-Tenorio A and KL Beattie. 2005. Low density DNA microarray for detection of most frequent TP53 missense point mutations. *BMC Biotechnology.* 5:8
93. Mendoza-Lorenzo P, Maldonado R, Pacheco R, Mendez A, Piña-Sanchez P, Rangel A, Vazquez-Ortiz G and Salcedo M. 2007. An oligoarray for the



- detection of human papillomavirus type 16 variants. *Int J Gynecol Cancer* 17: 1-9.
94. Li X, He Z and J Zhou. 2005. Selection of optimal oligonucleotide probes for microarrays using multiple criteria, global alignment and parameter estimation. *Nucleic Acid Res.* 33(19): 6114-6123.
  95. Koehler RT and N Peyret. 2005. Thermodynamic properties of DNA sequences: characteristic values for the human genome. *Bioinformatics.* 21(16): 3333-3339.
  96. He Z, Wu L, Li X, Fields MW and J Zhou. 2005. Empirical establishment of oligonucleotide probe design criteria. *App Environ Microbiol.* 71(7): 3753-3760.
  97. Matveeva OV, Shabalina SA, Nemtsov VA, Tsodikov AD, Gesteland RF and JF Atkins. 2003. Thermodynamic calculation and statistical correlations for oligo-probes design. *Nucleic Acid Res.* 31(14): 4211-4217.
  98. Tulpan D, Andronescu M, Chang SB, Shortred MR, Condon A, Hoss HH and LM Smith. 2005. Thermodynamically based DNA strand design. *Nucleic Acid Res.* 33(15): 4951-4964.
  99. Meissner JD. 1999. Nucleotide sequences and further characterization of human papillomavirus DNA present in the CaSki, SiHa and HeLa cervical carcinoma cell lines. *J Gen Virol.* 80: 1725-1733.
  100. Vernon SD, Unger ER and D Williams. 2000. Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting and hybrid capture. *J Clin Microbiol.* 38(2): 651-655.
  101. Chan P, Chang A, Cheung J, Chan D, Xu L, Tang N and A Cheng. 2002. Determinants of cervical human papillomavirus infection: differences between high- and low oncogenic risk types. *J Infect Dis.* 185: 28-35.
  102. Herrington CS, Anderson SM, Bauer HM, Tronccone B, de Angelis ML, Noell H, Chimera JA, Van Eyck SL and JO McGee. 1995. Comparative analysis of human papillomavirus detection by PCR and non-isotopic hybridization. *J Clin Pathol.* 48(5): 415-419.
  103. Hwang T. 1999. Detection and typing of human papillomavirus DNA by PCR using consensus primers in various cervical lesions of Korean women. *L Korean Med Sci.* 14(6): 593-599.
  104. González-Losa MR, Rosado-López I, Valdez-González N and M Puerto-Solís. 2004. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *J Clin Virol* 29(3): 203-206.
  105. Pina-Sanchez P, Hernandez-Hernandez DM, Lopez-Romero R, Vazquez-Ortiz G, Perez-Plasencia C, Lizano-Soberon M, Gonzalez-Sanchez JL, Cruz-Talonia F and M Salcedo. 2006. Human papillomavirus-specific viral types are common in Mexican women affected by cervical lesion. *Int J Gynecol Cancer.* 16: 1041-1047.
  106. Franceschi S, Clifford G and M Plummer. 2003. Prospects for primary prevention of cervical cancer in developing countries. *Salud Pública Mex* 45(3): S430-6.
  107. Pater MM and Pater A. 1985. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. *Virology* 145: 313-318.

108. American Types Cultures Cells. Cell Biology Collection. <http://www.atcc.org/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm>.
109. Rousseau MC, Villa LL, Costa MC, Abrahamowicz M, Rohan TE and Franco E. 2003. Ocurrente of cervical infection with multiple human papillomavirus types associated with age and cytologic abnormalities. *Sex Transm Dis.* 30(7): 581-587.
110. Rousseau MC, Abrahamowicz M, Villa LL, Costa MC, Rohan TE and Franco EL. 2003. Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 12(10): 1029-1037.
111. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, Balmaceda I, Greeberg MD, Alfaro M, Burk RD, Wacholder S, Plummer M and M Shiffman. 2000. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 92(6): 464-474.
112. Matos E, Loria D, Arnestoy GM, Herrera L, Prince MA, Moreno J, Krunfly C, vander Brule AJ, Meijer CJ, Muñoz N and R Herrero. 2003. Proyecto Concordia Collaborative Group. Prevalence of human papillomavirus infección among women in concordia, Argentina: a pupolation-based study. *Sex Trans Dis.* 30(8): 593-9.
113. Matsukura T and M Sugase. 2004. Human papillomavirus genomes in squamuos cell carcinomas of the uterine cervix. *Viol.* 324(2): 439-449.
114. Lee SA, Kang D, Seo SS, Jeong JK, Yoo KY, Jeon YT, Kim JW, Park NH, Kang SB, Lee HP and YS Song. 2003. Múltiple HPV infection in cervical cancer screened by HPV DNA Chip. *Cancer Lett.* 198(2): 187-192.
115. Fife KH, Kramer HM, Schroeder JM, Brown DR. 2001. Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J Med Virol.* 64(4):550-559.
116. Van der Graaf Y, Molijn A, Doormeward H, Quint W, VanDoom LJ and J Van den Tweel. 2002. Human papillomavirus and the long-term risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol.* 156(2): 158-164.
117. Cavuslu S, Mant C, Starkey WG, Bible JM, Biswas C, Kell B, Rice P, Best JM and J Cason. 1996. Analytic sensitivities of hybrid-capture, consensus and type-specific polimerase chain reaction for the detection of human papillomavirus type 16 DNA. *J Med Virol.* 49: 319-324.

# An oligoarray for the detection of human papillomavirus type 16 variants

P. MENDOZA-LORENZO\*, R. MALDONADO†, R. PACHECO†, A. MÉNDEZ†, P. PIÑA-SÁNCHEZ\*, A. RANGEL\*, G. VAZQUEZ-ORTÍZ\* & M. SALCEDO\*

\*Oncogenomics Laboratory, Oncology Diseases Research Unit, National Medical Center Siglo XXI-IMSS, Av. Mexico D.F., Mexico; and †DNA Technology Laboratory, National Biological Sciences, IPN, Mexico, D.F., Mexico

**Abstract.** Mendoza-Lorenzo P, Maldonado R, Pacheco R, Méndez A, Piña-Sánchez P, Rangel A, Vazquez-Ortiz G, Salcedo M. An oligoarray for the detection of human papillomavirus type 16 variants. *Int J Gynecol Cancer* 2007; 17:1–9.

On the basis of human papillomavirus (HPV) E6 gene mutations, there are more than five variants of HPV 16. We applied a sensitive and specific stacking hybridization assay using an oligoarray for the detection of Asian–American (AA) and European (E) (E-350G) HPV 16 variants. A simple glass slide was coated with capture probes consisting of short oligonucleotide DNA sequences (7–9 mers) specific for AA and E variants. Two different regions of the E6 HPV 16 gene were amplified with a set of two primers, which were used as target DNA. These targets were preannealed with auxiliary labeled oligonucleotides and hybridized to the oligoarray in the presence of specific and complementary capture probes. Our designed array based on shorter capture probes successfully discriminated between HPV 16 AA and E variants. The present DNA oligoarray system could be useful as a reliable technique for HPV 16 detection and does not require specialized equipment; nevertheless, further intra- and interlaboratories' studies are needed.

Persistent infection of high-risk human papillomavirus (HPV) represents the most important risk factor for the development of cervical cancer (CC) and its precursor lesions<sup>(1,2)</sup>. CC is one of the most common cancers worldwide, including Mexico<sup>(3,4)</sup>. HPV 16 is the most common virus type found in CC and high-grade squamous intraepithelial lesions worldwide (50–70%)<sup>(5,6)</sup>. The frequency of HPV 16 infection in Mexican population is reported similar to other countries<sup>(4,7,8)</sup>.

The high frequency of HPV 16 and its relation with CC have facilitated the study of its genomic variability, which has been used as a biologic model to study phylogeny, carcinogenic potential, immune response, and vaccine development<sup>(9–14)</sup>. On the basis of nucleotide substitutions, HPV 16 genome has been grouped into several phylogenetic lineages or variants: Asian–

American (AA), European (E), Asian (As), African (Af), and North American<sup>(15–17)</sup>. These variants are differentially distributed among the five continents, and the frequency of some of them correlates with the incidence of CC in different countries<sup>(9,18,19)</sup>. Some studies suggest that HPV 16–specific changes in genes such as E6, E7, and LCR could potentiate the oncogenic activity of certain variants. Recent studies found a high incidence of variants AA and E (both approximately 93.5%) in Mexicans with CC, where variant AA appears to be more oncogenic than variant E<sup>(20,21)</sup>.

The genetic heterogeneity of HPV 16 E6 gene in three missense base substitution sites permits the detection and discrimination of variants AA and E. Two of these G145T and T183G are present in AA variant (G145T is present in subvariants a, b, and c and T183G only in subvariant c, and hence, it unequivocally identifies this subvariant), while T350G mutation is characteristic of variant E. Other additional important changes to distinguish are the C143G that identifies to the Af variant and the T178G that identifies to the As variant. Unfortunately, we could not identify any specific change substitution about North American variant on this virus gene.

□ Address correspondence and reprint requests to: Dr Mauricio Salcedo, Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, Av. Cuauhtémoc 330, Col. Doctores, C. P. 06725, México D. F., México. Email: maosal89@yahoo.com

doi:10.1111/j.1525-1438.2007.00832.x

# Author Query Form

**Journal: International Journal of Gynecological Cancer**

**Article : ijc\_832**

Dear Author,

During the copy-editing of your paper, the following queries arose. Please respond to these by marking up your proofs with the necessary changes/additions. Please write your answers on the query sheet if there is insufficient space on the page proofs. Please write clearly and follow the conventions shown on the attached corrections sheet. If returning the proof by fax do not write too close to the paper's edge. Please remember that illegible mark-ups may delay publication.

Many thanks for your assistance.

Query No.	Query	Remark
1	Please check the short title introduced.	
2	Please provide the academic degrees of the corresponding author in the correspondence field.	
3	Please provide the keywords for the article.	
4	Please spell out "SSCP" in the sentence "The recent advances ..."	
5	Please check if "P1-P7" can be changed to "P1-P8" in the sentence "The capture probes (target probes) ...."	
6	Please check the state name "NC" introduced for "High Point" in the sentence "All capture probes ..."	
7	Note that "synthetic targets DNA" and "synthetic DNA targets" have been abbreviated to "stDNA" throughout the text. Please check if this is correct.	
8	Note that the phrase "more specify" in the sentence "It is worth noting that ..." is not clear. Please check.	
9	Please provide the supplier details (city, state, and country if not USA) for "InVitrogen Corp" in the sentence "Prior to hybridization on the ..."	
10	Please spell out "SSC" and "EDTA" in the sentence "The preannealing reaction ..." and "EDTA" also in the sentence "The hybridization cocktail contained ...."	
11	Note that "50 20× μL SSC" has been changed to "50 μL 20×	

SSC" in the sentence "The preannealing reaction mix contained ...." Please check.

---

12 Please check the edits made to the sentence "Nonincorporated molecules were removed ...."

---

13 Please spell out "dNTP" in the sentence "All PCR reaction conditions were ..."

---

14 Please check the edits made to the sentence "All the PCR products were ..."

---

15 Please check the edits made to the sentence "Gene variations in different ...."

---

16 Note that the representations "E-350G" and "E350G" and "E-350T" and "E350T" are used in the text. Please check and make it consistent.

---

17 Please clarify what "ntd" refers to "Short capture probes ..."

---

18 Please provide the names of the authors in reference 2.

---

19 Note the spelling of the author "Shiffman" in reference 12 has been changed to "Schiffman." Please check.

---

20 Please check the names of the first two authors in reference 21.

---

21 Please update reference 27.

---

22 Note the reference 31 is not cited. Please provide an in-text citation or delete it from the list.

---

23 Please check the volume number and the page range of reference 38.

---

24 All figures are in low resolution. Please provide high resolution figures at 300 dpi. For more information about supplying electronic artwork, please see the journal webpage or our electronic artwork guidelines at <http://www.blackwellpublishing.com/authors/digill.asp>

---