

Estandarización de una qPCR multiplex del oncogén E7 para genotipificación de Virus del
Papiloma Humano de alto riesgo

Brigitte Ofelia Peña López

Trabajo de Grado para Optar al Título de Magíster en Microbiología

Director

Bladimiro Rincón Orozco

Doctor en Ciencias Naturales

Codirector

Ruth Aralí Martínez Vega

Doctora en Ciencias de la Salud Pública Enfermedades Infecciosas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de Salud

Escuela de Microbiología

Maestría en Microbiología

Bucaramanga

2021

Dedicatoria

A Jefferson, del colectivo por los animales UIS,
por inspirar en las personas los actos más nobles,
por su sensibilidad de no omitir a otros animales,
por sus grandes esfuerzos,
por su amor y amistad.

Agradecimientos

A mis directores, los profesores Ruth Martínez y Bladimiro Rincón, porque gracias a ellos puedo imaginar que cosas buenas pueden pasar.

A mis padres por las segundas oportunidades y por su apoyo económico.

A todos los miembros del Laboratorio de Genética Molecular de Enfermedades Infecciosas y Cáncer (GEMEICA) por su incansable apoyo y por la experiencia de construir algo grande juntos.

A Hitler, el gato de Guatiguará, por su cálida compañía

A Harry, mi perro por ser mi fuerza impulsora.

Tabla de Contenido

| | Pág. |
|--|-------------|
| Introducción..... | 15 |
| 1. Objetivos..... | 19 |
| 1.1. Objetivo general..... | 19 |
| 1.2. Objetivos específicos..... | 19 |
| 2. Cuerpo del trabajo..... | 20 |
| 2.1. Marco referencial..... | 20 |
| 3. Método..... | 30 |
| 3.1 Tipo de investigación..... | 30 |
| 3.2 Para la resolución del objetivo específico 1..... | 30 |
| 3.2.1. Selección de muestras cervicales..... | 30 |
| 3.2.2. Extracción de ADN..... | 31 |
| 3.2.3. Control de extracción de ADN..... | 32 |
| 3.2.4. Diseño de cebadores específicos para los ORFs de E6/E7..... | 32 |
| 3.2.5. Amplificación de los ORFs de E6/E7..... | 32 |
| 3.2.6. Electroforesis en gel de agarosa..... | 33 |
| 3.2.7. Células competentes..... | 34 |
| 3.2.8. Ensayo de competitividad..... | 34 |
| 3.2.9. Clonación del ORF de E6/E7..... | 35 |
| 3.2.10. Extracción de ADN plasmídico..... | 35 |
| 3.2.11. Control de extracción de ADN plasmídico..... | 36 |
| 3.2.12. Secuenciación del ORF de E6/E7..... | 36 |

| | |
|---|----|
| 3.3. Para la resolución del objetivo específico 2..... | 36 |
| 3.3.1. Diseño de cebadores y sondas Taqman..... | 36 |
| 3.3.2. Construcción de curvas estándar..... | 38 |
| 3.3.3. Optimización de las condiciones de la qPCR..... | 39 |
| 3.3.4. PCR digital en gotas (ddPCR)..... | 40 |
| 4. Resultados..... | 41 |
| 4.1. Aislamiento y clonación de los ORFs de E7 de los 14 genotipos de VPH-AR para ser utilizados como gen blanco en la qPCR multiplex del oncogén E7..... | 41 |
| 4.1.1. Características de las muestras cervicales seleccionadas, del ADN extraído y del control de extracción..... | 41 |
| 4.1.2. Cebadores específicos diseñados para los ORFs de E6/E7 de cada VPH-AR..... | 43 |
| 4.1.3. Amplificación de los ORFs de E6/E7 de cada VPH-AR..... | 44 |
| 4.1.4. Ensayo de competitividad..... | 45 |
| 4.1.5. Clonación del ORF de E6/E7 para cada VPH-AR..... | 45 |
| 4.2. Estandarización de cuatro qPCR multiplex del oncogén E7 para la detección de 14 genotipos de VPH-AR..... | 50 |
| 4.2.1. Diseño de cebadores y sondas Taqman..... | 50 |
| 4.2.2. Optimización de las condiciones de la qPCR: Sistema Evagreen..... | 54 |
| 4.2.3. Construcción de curvas estándar..... | 57 |
| 4.2.4. Optimización de las condiciones de la qPCR con sondas de hidrólisis..... | 65 |
| 4.2.5. Verificación de concentraciones de E7 en los estándares utilizados en la qPCR multiplex de E7 utilizando PCR digital en gotas (ddPCR)..... | 71 |
| 4.2.6. Normalización de las concentraciones de copias de E7 de los estándares por ddPCR..... | 73 |

| | |
|---|-----|
| 5. Discusión..... | 80 |
| 5.1. Condiciones de la qPCR..... | 80 |
| 5.2. Comparación de qPCR utilizando estándares plasmídicos circulares y lineales..... | 81 |
| 5.3. ddPCR para la verificación de concentraciones de E7 en los estándares utilizados en la qPCR multiplex de E7..... | 84 |
| 5.4. Fluorescencia durante la qPCR..... | 88 |
| 5.5. Eficiencia de la qPCR..... | 89 |
| 5.6. Sensibilidad analítica de la qPCR..... | 91 |
| 5.7. Variabilidad del oncogén E7 de algunos VPH-AR..... | 93 |
| 5.8. Cuantificación del oncogén E7..... | 98 |
| 6. Limitaciones..... | 100 |
| 7. Conclusiones..... | 101 |
| 8. Recomendaciones y perspectivas..... | 102 |
| Referencias bibliográficas..... | 103 |
| Apéndices..... | 123 |

Lista de Tablas

| | Pág. |
|---|-------------|
| Tabla 1. Componentes de la reacción de amplificación de los ORFs de E6/E7..... | 33 |
| Tabla 2. Programa de amplificación de los ORFs de E6/E7..... | 33 |
| Tabla 3. Disposición de las cuatro pruebas multiplex para la detección de los 14 genotipos de VPH-AR..... | 37 |
| Tabla 4. Muestras cervicales seleccionadas por genotipo y características del ADN extraído..... | 42 |
| Tabla 5. Características de los cebadores específicos para los ORFs de E6/E7 de cada VPH-AR..... | 43 |
| Tabla 6. Confirmación de clonación del plásmido de E6/E7 de cada de VPH-AR por secuenciación Sanger..... | 48 |
| Tabla 7. Mutaciones génicas encontradas en el ORF de E7 de algunos genotipos de VPH-AR..... | 50 |
| Tabla 8. Cebadores y sondas Taqman diseñados dirigidos a la región E7 de VPH-AR y a Beta tubulina..... | 51 |
| Tabla 9. Componentes de la qPCR de E7 estandarizada con EvaGreen..... | 56 |
| Tabla 10. Programa de amplificación de la qPCR de E7 estandarizada con EvaGreen..... | 57 |
| Tabla 11. Componentes de la qPCR multiplex de E7 de VPH-AR..... | 66 |
| Tabla 12. Programa de amplificación de la qPCR multiplex de E7 de VPH-AR..... | 66 |
| Tabla 13. Resultados de la qPCR multiplex de E7 de VPH-AR con muestras agrupadas de pacientes..... | 79 |

Lista de Figuras

| | Pág. |
|---|-------------|
| Figura 1. Progresión de lesiones intraepiteliales cervicales..... | 26 |
| Figura 2. Frecuencia de los genotipos de VPH detectados en mujeres entre los 35 y 65 años residentes en Bucaramanga, 2016 a 2018..... | 28 |
| Figura 3. Amplificación de los ORFs de E6/E7 de cada VPH-AR..... | 44 |
| Figura 4. Transformación de células competentes con ORF E6/E7 de cada VPH-AR..... | 46 |
| Figura 5. Confirmación de la clonación del ORF E6/E7 de cada VPH-AR: Digestión enzimática..... | 47 |
| Figura 6. Confirmación de clonación: Amplificación de un fragmento del ORF E7 de cada VPH-AR..... | 47 |
| Figura 7. Inconcordancias en el cebador directo y la sonda dirigidos al oncogén E7 de VPH-6853 | |
| Figura 8. Amplificación de E7 de cada VPH-AR aplicando un gradiente de temperatura de 55°C a 60°C..... | 54 |
| Figura 9. Amplificación de la dilución 10 ³ de VPH-AR con diferentes concentraciones de cebadores..... | 55 |
| Figura 10. Amplificación de la dilución 10 ⁶ de VPH-AR con previa digestión enzimática..... | 56 |
| Figura 11. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-16..... | 58 |
| Figura 12. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-18..... | 59 |
| Figura 13. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-31..... | 59 |
| Figura 14. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-33..... | 60 |
| Figura 15. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-35..... | 60 |

| | |
|--|----|
| Figura 16. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-39..... | 61 |
| Figura 17. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-45..... | 61 |
| Figura 18. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-51..... | 62 |
| Figura 19. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-52..... | 62 |
| Figura 20. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-56..... | 63 |
| Figura 21. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-58..... | 63 |
| Figura 22. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-59..... | 64 |
| Figura 23. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-68..... | 64 |
| Figura 24. Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-73..... | 65 |
| Figura 25. Curvas de amplificación y estándar de los genotipos de VPH-AR de la primera qPCR multiplex..... | 67 |
| Figura 26. Curvas de amplificación y estándar de los genotipos de VPH-AR de la segunda qPCR multiplex..... | 68 |
| Figura 27. Curvas de amplificación y estándar de los genotipos de VPH-AR de la tercera qPCR multiplex..... | 69 |
| Figura 28. Curvas de amplificación y estándar de los genotipos de VPH-AR de la cuarta qPCR multiplex..... | 70 |
| Figura 29. Curvas de amplificación y estándar de qPCR de Beta tubulina..... | 71 |
| Figura 30. Amplitud de fluorescencia y número de gotas generadas en la ddPCR de E7 de cada VPH-AR..... | 72 |
| Figura 31. Concentración de cada genotipo de VPH-AR en copias/microlitro..... | 73 |
| Figura 32. Curvas de amplificación y estándar de la primera qPCR multiplex de E7 de VPH-AR post normalización por ddPCR..... | 74 |

| | |
|--|----|
| Figura 33. Curvas de amplificación y estándar de la segunda qPCR multiplex de E7 de VPH-AR post normalización por ddPCR..... | 75 |
| Figura 34. Curvas de amplificación y estándar de la tercera qPCR multiplex de E7 de VPH-AR post normalización por ddPCR..... | 76 |
| Figura 35. Curvas de amplificación y estándar de la cuarta qPCR multiplex de E7 de VPH-AR post normalización por ddPCR..... | 77 |
| Figura 36. Curvas de amplificación de las cuatro qPCR multiplex de E7 de VPH-AR con muestras cervicovaginales agrupadas..... | 78 |

Lista de Apéndices

| | Pág. |
|--|-------------|
| Apéndice A. Curvas de amplificación y estándar de VPH-16 a partir de la primera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 123 |
| Apéndice B. Curvas de amplificación y estándar de VPH-18 a partir de la primera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 124 |
| Apéndice C. Curvas de amplificación y estándar de VPH-31 a partir de la primera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 125 |
| Apéndice D. Curvas de amplificación y estándar de VPH-33 a partir de la primera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 126 |
| Apéndice E. Curvas de amplificación y estándar de VPH-35 a partir de la segunda multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 127 |
| Apéndice F. Curvas de amplificación y estándar de VPH-39 a partir de la segunda multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 128 |
| Apéndice G. Curvas de amplificación y estándar de VPH-45 a partir de la segunda multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 129 |
| Apéndice H. Curvas de amplificación y estándar de VPH-51 a partir de la segunda multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 130 |
| Apéndice I. Curvas de amplificación y estándar de VPH-52 a partir de la tercera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 131 |
| Apéndice J. Curvas de amplificación y estándar de VPH-56 a partir de la tercera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 132 |

| | |
|--|-----|
| Apéndice K. Curvas de amplificación y estándar de VPH-58 a partir de la tercera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 133 |
| Apéndice L. Curvas de amplificación y estándar de VPH-59 a partir de la tercera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 134 |
| Apéndice M. Curvas de amplificación y estándar de VPH-68 a partir de la cuarta multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 135 |
| Apéndice N. Curvas de amplificación y estándar de VPH-73 a partir de la cuarta multiplex antes y después de la normalización por ddPCR..... | 136 |

Resumen

Título: Estandarización de una qPCR multiplex del oncogén E7 para genotipificación de Virus del Papiloma Humano de alto riesgo ^{1*}

Autor: Brigitte Ofelia Peña López^{2**}

Palabras Clave: Infecciones por Papilomavirus, Neoplasias del cuello uterino, Genotipificación, Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real, Oncogén E7.

Descripción: La infección persistente con Virus del Papiloma Humano de Alto Riesgo (VPH-AR) induce cáncer cervical. Para su detección se realizan pruebas moleculares que amplifican el gen L1 del VPH. Sin embargo, a diferencia del gen L1, que puede perderse hasta en el 11% de los casos durante la integración del ADN viral en el genoma del hospedero originando falsos negativos, el oncogén E7 se expresa durante todas las etapas de progresión de la enfermedad.

El objetivo de este trabajo fue estandarizar cuatro PCR multiplex en tiempo real del oncogén E7 (qPCR multiplex de E7) para genotipificación y cuantificación de 14 VPH-AR. Para esto se aislaron y ligaron en un vector de clonación los marcos de lectura abiertos del gen E7 de VPH-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58 -59, -68 y -73. Estos se emplearon como genes blanco en la estandarización de la qPCR multiplex de E7 y se usaron cebadores y sondas de hidrólisis específicamente diseñados para cada genotipo. Como estándar de referencia se utilizó la genotipificación de VPH por hibridación reversa dot blot del gen L1.

Los resultados muestran que la E7-qPCR amplificó los 14 genotipos de VPH-AR con límites de detección desde 10 copias, ciclos umbrales de cuantificación (Cq) desde 18 ciclos, análisis de curva de fusión que revelan productos específicos con picos de fusión entre 78,5-83,0°C, eficiencias entre el 82 y 111%; con pendientes de la curva alrededor de -3,8 y -3,0 y valores $R^2 > 0,97$.

La qPCR multiplex de E7 fue capaz de detectar y cuantificar 14 genotipos de VPH-AR con una excelente especificidad y sensibilidad analíticas. Considerando estos resultados esta prueba podría ser más sensible para diagnosticar infecciones por VPH-AR, por lo tanto, se espera continuar con un estudio de evaluación de tecnología diagnóstica de fase 2.

^{1*} Trabajo de Grado

^{2**} Facultad de Salud. Escuela de Microbiología. Maestría en Microbiología. Director: Bladimiro Rincón Orozco. Doctor en Ciencias Naturales. Codirector Ruth Aralí Martínez Vega. Doctora en Ciencias de la Salud Pública Enfermedades Infecciosas.

Abstract

Title: Standardization of a multiplex qPCR of the E7 oncogene for genotyping of high-risk Human Papillomavirus^{3*}

Author: Brigitte Ofelia Peña López^{4**}

Key Words: Papillomavirus Infections, Uterine Cervical Neoplasms, Genotyping, Real-time Polymerase Chain Reaction, E7 Oncogene.

Description: Persistent infection with High-Risk Human Papillomavirus (HR-HPV) induces cervical cancer. For its detection, molecular tests are carried out that amplify the HPV L1 gene. However, unlike the L1 gene, which can be lost in up to 11% of cases during the integration of viral DNA into the host genome causing false negatives, the E7 oncogene is expressed during all stages of disease progression.

The objective of this work was to standardize four real-time multiplex PCR of the E7 oncogene (E7 multiplex qPCR) for genotyping and quantification of 14 HR-HPV. For this, the open reading frames of the HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58 -59, -68 and -73 E7 gene were isolated and ligated in a cloning vector. These were used as target genes in the standardization of the E7 multiplex qPCR and hydrolysis primers and probes specifically designed for each genotype were used. As a reference standard, HPV genotyping by dot blot reverse hybridization of the L1 gene was used.

The results show that the E7-qPCR amplified the 14 HR-HPV genotypes with detection limits from 10 copies, threshold cycles of quantification (Cq) from 18 cycles, melting curve analysis revealing specific products with melting peaks between 78.5-83.0 ° C, efficiencies between 82 and 111%; with slopes of the curve around -3.8 and -3.0 and R2 values > 0.97.

The E7 multiplex qPCR was able to detect and quantify 14 HR-HPV genotypes with excellent specificity and analytical sensitivity. Considering these results, this test could be more sensitive to diagnose HR-HPV infections, therefore, it is expected to continue with a phase 2 diagnostic technology evaluation study.

^{3*}Degree Work

^{4**} Faculty of Health. School of Microbiology. Master's in Microbiology. Director: Bladimiro Rincón Orozco. Doctor in Natural Sciences. Co-director Ruth Aralí Martínez Vega. Doctor of Public Health Sciences Infectious Diseases.

Introducción

El cáncer de cuello uterino (CCU) es causado por la infección persistente del epitelio cervical con los genotipos de alto riesgo del virus del papiloma humano (VPH-AR) (zur Hausen, 1989). Por medio de pruebas moleculares es posible detectar la presencia de ADN viral de estos genotipos a partir de muestras obtenidas del cérvix, de esta manera se puede identificar a las mujeres en riesgo y prevenir el desarrollo de este cáncer (Cuzick et al., 2000).

En comparación con la citología, las pruebas de ADN son más eficientes en la identificación de una Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC) de alto grado, por lo tanto, brindan mayor seguridad en la prevención de patologías malignas de cuello uterino (Cuzick et al., 2000).

Muchos protocolos se basan en la amplificación de ADN mediante PCR utilizando diferentes cebadores que se dirigen principalmente hacia la región L1 del virus, que posteriormente permite la diferenciación en genotipos por medio de sondas específicas llevando a cabo una hibridización de los productos de la PCR. Sin embargo, existen regiones diana de mayor significancia clínica y epidemiológica como son los oncogenes E6 y E7, indispensables en el proceso cancerígeno de cuello uterino y presentes durante todas las etapas de la progresión de la enfermedad, a diferencia del gen L1 que puede interrumpirse durante la integración del ADN viral en el genoma del hospedador hasta en el 11% de las veces, y por tanto no se detecta con las pruebas cuya diana es este gen (Doorbar et al., 2015; Tjalma & Depuydt, 2013).

Por lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo estandarizar una PCR multiplex en tiempo real con cebadores y sondas dirigidos contra el oncogén E7 para la detección de 14 genotipos de VPH-AR (VPH-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68 y -73).

Planteamiento del problema y de la pregunta de investigación

Según la OMS el CCU es el primer cáncer causado completamente por una infección viral, siendo el segundo más frecuente en mujeres, con cerca de 570.000 casos nuevos y más de 300.000 muertes al año en el mundo (Baseman & Koutsky, 2005; Ferlay et al., 2015; IARC, 2018). En Colombia, el CCU es la tercera causa de incidencia de enfermedad oncológica y la segunda causa de muerte por neoplasias malignas en mujeres, con cerca de 5.600 casos nuevos por año (21,5 casos nuevos por 100.00 mujeres) y 10 muertes por 100.000 mujeres diagnosticadas con la enfermedad en el año 2018 (Bray et al., 2018). Esto sumado al alto costo social y económico que representa, convierte a CCU en un problema de salud pública para el país. En respuesta a esto, en Colombia se ha aumentado la cobertura de los programas de prevención de CCU. Sin embargo, las mujeres aún presentan dificultades para acceder a servicios de salud de alta calidad, que permitan el diagnóstico especializado y el tratamiento oportuno de esta enfermedad oncológica (Ministerio de Salud y Protección Social, n.d.).

El VPH es la causa necesaria del CCU, sin embargo, no todas las infecciones por VPH progresan a cáncer. Para que una lesión precancerosa evolucione a CCU debe existir una infección persistente por VPH-AR (Doorbar, 2006; zur Hausen, 1989). Además, la mayoría de las infecciones por VPH son subclínicas, por esta razón, no solo es importante identificar las mujeres infectadas por VPH sino también genotipificar el virus (Cuzick et al., 2000). Existen 15 genotipos

de VPH-AR catalogados como carcinogénicos o probablemente carcinogénicos (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -39, -45, -51, -52, -56, -58, -59, -68, -73 y -82) (McGuire, 2016; Muñoz et al., 2003, 2006).

Actualmente, se realiza tamización para detectar lesiones precancerosas por medio de la citología debido a su alta especificidad (90%) (Cuzick et al., 2006). Sin embargo, en el momento de diagnosticar lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado (HSIL), este método alcanza un porcentaje de falsos negativos entre el 42 y el 61% y no logra tener una sensibilidad del 50% (Murillo et al., 2011). Lo anterior se relaciona principalmente con la calidad de la muestra, la pericia del profesional para identificar alteraciones morfológicas y la subjetividad en la interpretación de los resultados (Cuzick et al., 2006). Por esta razón, se han desarrollado técnicas moleculares, las cuales han demostrado mayor sensibilidad en la detección de VPH y además permiten la genotipificación del virus (Cuzick et al., 2000).

La mayoría de los protocolos de pruebas moleculares que existen en el mercado se basan en la amplificación del gen L1 de VPH debido a que es altamente conservado (Buck et al., 2013). No obstante, este sistema tiene algunas desventajas, al ser un gen tan conservado hay reacciones cruzadas con los otros 180 genotipos de VPH que existen en la piel y mucosas y que no causan enfermedad, provocando un porcentaje importante de pruebas indeterminadas (Torrado et al., 2018). Adicionalmente, se ha reportado que el marco de lectura abierto de este gen puede perderse cuando el virus se integra en el genoma de la célula hospedadora. Este fenómeno se observa hasta en el 11% de las infecciones por genotipos de VPH-AR y provoca un porcentaje importante de falsos negativos (Buck et al., 2013; Tjalma & Depuydt, 2013).

En consecuencia, se han desarrollado sistemas de PCR que utilizan cebadores dirigidos hacia el oncogén E7 (Andersson, 2012; Comar et al., 2012; Paes et al., 2015; Sotlar et al., 2004). Este no se modifica durante la integración viral, se expresa de manera creciente y continua, es responsable de que las infecciones sean persistentes, es necesario para la progresión y el mantenimiento tumoral, y promueve un fenotipo maligno de los queratinocitos del cuello uterino en aquellas mujeres que no logran resolver la infección (Doorbar et al., 2015; zur Hausen, 1989).

La piedra angular de la lucha contra el cáncer es lograr su identificación temprana para disminuir la carga de esta enfermedad (Anderson et al., 2008). Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados en el mundo para combatir el CCU, la reducción de la mortalidad por esta causa sigue siendo insuficiente (Bray et al., 2018). Por lo anterior, resulta necesario estandarizar y posteriormente validar una herramienta diagnóstica que permita detectar la presencia del virus en muestras cervicales, incluso en aquellas que han perdido el gen L1. Esta herramienta permitiría realizar un diagnóstico más certero y un adecuado seguimiento a las pacientes que lo necesitan, contribuyendo a la disminución de la incidencia, la discapacidad y la mortalidad ocasionadas por CCU.

Según lo anterior, se buscó resolver la siguiente pregunta de investigación ¿La nueva PCR multiplex en tiempo real del oncogén E7 es capaz de detectar y genotipificar 14 VPH-AR?

1. Objetivos

1.1. Objetivo General

Estandarizar una PCR multiplex en tiempo real del oncogén E7 para genotipificación de VPH-AR.

1.2. Objetivos Específicos

Amplificar y clonar en un vector de clonación los marcos de lectura abiertos (ORFs) de E7 de 14 genotipos de VPH-AR para ser utilizados como genes blanco en la qPCR multiplex del oncogén E7.

Estandarizar cuatro qPCR multiplex del oncogén E7 con sondas tipo Taqman para la detección de 14 genotipos de VPH-AR.

2. Cuerpo del Trabajo

2.1. Marco Referencial

El CCU es una enfermedad progresiva, inicialmente se dan cambios intra-epiteliales pre-malignos que van desde neoplasia intraepitelial cervical grado 1 (NIC-1) o displasia leve, hasta NIC-3 y carcinoma *in situ* propiamente dicho (ÖStör, 1993).

La asociación entre la infección por VPH y CCU es de las más consistentes en cancerología humana (zur Hausen, 2009). VPH pertenece a la familia *Papovaviridae*, incluido en el género *Papilomavirus*. Los papilomavirus son especie específicos y están ampliamente distribuidos en la naturaleza, infectan aves, reptiles, marsupiales y mamíferos. Los VPH que infectan específicamente a seres humanos son de tamaño pequeño, no encapsulados, con estructura icosaédrica y doble cadena de ADN circular. Dentro de la complejidad de su genoma se han caracterizado regiones que se expresan temprana o tardíamente. Los genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) codifican proteínas asociadas a la regulación, replicación y transcripción del ADN viral y son responsables de inducir la proliferación de las células basales y parabasales provocando hiperplasia epitelial. Los genes tardíos (L1 y L2) expresan las proteínas estructurales de la cápside viral (Doorbar, 2006; Doorbar et al., 2015).

Inicialmente, el genoma de VPH puede permanecer latente en forma extracromosómica sin producir lesiones celulares, o bien, puede reproducirse a medida que se diferencian las células epiteliales. VPH tiene como blanco a las células de la capa basal del epitelio, a las que puede llegar

por efracción de la piel o mucosa, provocando en ocasiones lesiones benignas que pueden permanecer subclínicas durante períodos prolongados de tiempo (Doorbar et al., 2012).

Las personas entre 18 y 30 años son las más afectadas por infecciones genitales causadas por VPH, su respuesta inmunológica va a condicionar el curso de la infección. En pacientes inmunocompetentes el 70% de las infecciones se resuelven al término de un año y hasta el 90% en el segundo año, solo entre el 5 y 10% serán infecciones persistentes que podrían generar lesiones precancerosas con posibilidades de convertirse en CCU (Ministerio de Salud y Protección Social, n.d.; Stanley, 2010; Veldhuijzen et al., 2010).

El VPH se clasifica según el riesgo de progresión a patologías oncológicas en VPH de bajo y de alto riesgo. Aquellos de bajo riesgo son los causantes de verrugas genitales (VPH-6 y -11 en el 90% de los casos), mientras que los de alto riesgo se asocian con cáncer de cuello uterino, ano, vagina, vulva, pene y orofaringe (Bernard et al., 2010; Franco, 2003). De los 15 VPH-AR, los genotipos VPH-16 y -18 aportan más del 70% de los casos de CCU (Li et al., 2011).

CCU es uno de los procesos tumorales mejor estudiados y conocidos, ha sido relativamente de fácil identificación y abordaje terapéutico desde hace más de medio siglo. Cada año se diagnostican aproximadamente 570.000 casos nuevos y es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres en el mundo, presentándose con mayor frecuencia en los países menos desarrollados (IARC, 2018). En Latinoamérica, los programas de prevención buscan mejorar sus estrategias para evitar que en el año 2025 el número de casos aumente de 68.000 a 126.000 (Ferlay et al., 2010).

Se ha establecido que la incidencia anual de casos de CCU en Colombia es de 18,7 casos por cada 100.000 mujeres, y el Ministerio de Salud y Protección Social (MinSalud) ha determinado que es la primera causa de muerte por cáncer entre mujeres colombianas de 30 a 59 años, con aproximadamente 5 muertes diarias, es decir, cerca de 2.000 mujeres mueren anualmente en Colombia por esta enfermedad (Ministerio de Salud y Protección Social, n.d.).

En nuestro país la prevención del CCU se centra en acciones de prevención primaria (vacunación) y secundaria (tamización). La citología cérvico uterina es la herramienta utilizada por nuestro sistema de salud hace más de 30 años para detectar tempranamente lesiones premalignas y remitir posteriormente a tratamiento. La detección consiste en obtener células del cuello uterino para buscar alteraciones morfológicas y determinar si hay lesiones (Ministerio de Salud y Protección Social, 2012).

No obstante, la deficiente calidad en la toma de muestras, la subjetividad en la lectura de la citología, la baja cobertura, las dificultades en el seguimiento de las pacientes y el acceso poco oportuno a la confirmación diagnóstica y al tratamiento de lesiones cervicales precancerosas o cáncer, han condicionado la eficacia de la prueba dentro del marco de los programas de prevención de CCU, situación que es similar a la de otros países de bajos y medianos ingresos (Cuzick et al., 2006). Todas estas barreras socioculturales, técnicas y del sistema de salud podrían explicar por qué en Colombia no hay relación entre cobertura de citología y reducción de la mortalidad por CCU (García-López et al., 2017).

Adicionalmente, en uno de los metaanálisis más extensos realizados hasta la fecha, se encontró que de las mujeres con citologías cervicales normales el 11,7% cursan con una infección por VPH detectable por otros métodos (Bruni et al., 2010). Dada la baja sensibilidad de la citología, en el mundo se han discutido otras alternativas de tamización, dentro de las cuales han ocupado un lugar importante las pruebas moleculares. Estas permiten no sólo la identificación de VPH, al determinar la presencia del virus en los tejidos infectados, sino la discriminación de la infección por genotipos de bajo y alto riesgo (Cuzick et al., 2006).

En relación con la tamización, Colombia ha introducido, como alternativas a la citología, técnicas de inspección visual como la colposcopia que permiten abordajes programáticos en los que se tamiza y se trata a una mujer en una única visita, y pruebas de ADN-VPH que incrementan la sensibilidad y reducen los problemas de control de calidad (Sistema General de Seguridad Social en Salud - Colombia, 2014).

La colposcopia es un examen que facilita la observación del cérvix mediante la ayuda de un instrumento conocido como colposcopio, el cual permite iluminar y magnificar la zona expuesta. Con el objetivo de examinar zonas de transformación y anormalidad, durante el procedimiento se aplica solución salina, ácido acético y lugol yodado, estas soluciones dan una tonalidad característica a las lesiones, aumentando la sensibilidad de detección (Gattoc & Flowers, 2015).

Actualmente, están en curso estudios aleatorizados comparando la citología convencional con la prueba ADN-VPH, y se cuenta con evidencia de la capacidad de dicha prueba para reducir la mortalidad por CCU (Koliopoulos et al., 2017). Con base en los estudios de eficacia, la Food

and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos, aprobó el uso de la prueba ADN-VPH combinada con citología como técnica de tamización primaria para mujeres mayores de 30 años (Franco, 2003).

Basado en las anteriores consideraciones, el Instituto Nacional de Cancerología (INC), ente asesor del MinSalud, recomendó la adopción del algoritmo aprobado por la FDA incorporando las pruebas de detección del ADN de VPH en células del cuello uterino como base de la tamización de CCU en Colombia (Rincón Martínez & García Peralta, 2012). En este contexto, en el 2009 el INC decidió implementar un programa de tamización basado en pruebas de ADN-VPH y en el 2011 el MinSalud incluyó las pruebas moleculares para la detección de VPH en el Plan Obligatorio de Salud (POS) (Gamboa et al., 2008; Instituto Nacional de Cancerología, 2007). En la actualidad, Colombia cuenta con una oferta de pruebas y plataformas tecnológicas de por lo menos una docena de casas comerciales para realizar tamización molecular en laboratorios clínicos. Se contemplan diversas metodologías basadas en la amplificación por PCR, southern blot, dot blot e hibridación *in situ*.

La mayoría de las casas comerciales se basan en la amplificación por PCR múltiple de un segmento del gen L1 utilizando cebadores degenerados (GP5+/GP6+). Estas pruebas permiten diferenciar la infección por genotipos de VPH-AR y VPH-BR (Rincón et al., 2017). Sin embargo, se ha visto que la coamplificación del gen L1 de diferentes genotipos de VPH compite con la amplificación de los genotipos de VPH-AR. Una forma de resolver esta desventaja es diseñando cebadores específicos para cada genotipo de VPH y así evitar la competencia de amplificación del ADN de múltiples infecciones (Schmitt et al., 2010).

Por otra parte, se ha encontrado que en pacientes con NIC-2, NIC-3 y carcinoma *in situ* existe una menor expresión de la proteína L1 que en pacientes con NIC-1 (Figura 1) (21); esto sugiere que la expresión de L1 tiene una relación inversa con el grado de lesiones cervicales, es decir, la deficiencia de L1 se puede atribuir a la progresión de las lesiones (Arafa et al., 2008; Bin et al., 2013).

En este sentido, se ha encontrado que durante la progresión a CCU ocurre el fenómeno de integración del ADN viral en el genoma de la célula hospedadora. En este proceso, el ADN viral sufre una ruptura de la doble cadena en la que, dependiendo del lugar de corte, se pueden perder diferentes marcos de lectura abiertos (ORF, por sus siglas en inglés) (McBride & Warburton, 2017; Pett & Coleman, 2007; Yu et al., 2005). Principalmente, el corte sobre el ADN viral se da sobre la región E1/E2, pero también puede ocurrir sobre el ORF del gen L1. E2 es el principal represor de la transcripción de E6 y E7, en ausencia de este punto crítico de control se va a regular positivamente la transcripción de estos oncogenes (Doorbar et al., 2015; Mesri et al., 2014).

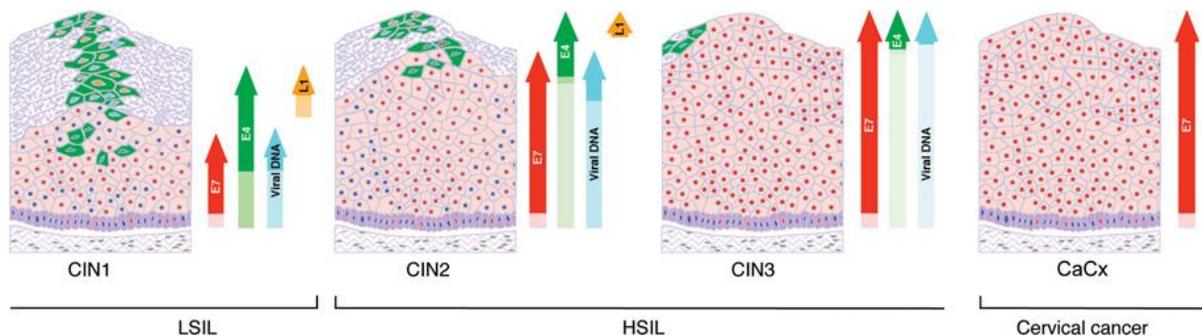
Los queratinocitos cancerosos del cuello uterino positivos para VPH-AR son dependientes de E7 (Goodwin et al., 2000). Este gen codifica una oncoproteína potente que promueve la proliferación y supervivencia celular continua. E7 regula vías de señalización celular que median la degradación del supresor tumoral de retinoblastoma (pRB), provocando en los queratinocitos un estado de síntesis de ADN, atenuación de la respuesta de senescencia y evasión de los supresores de tumores (McLaughlin-Drubin et al., 2012; Moody & Laimins, 2010; Roman & Munger, 2013). Además, E7 contribuye en la transición epitelio-mesénquima, induce la angiogénesis, desregula el metabolismo celular y promueve la amplificación de los centrosomas,

dando lugar a mitosis multipolares e induciendo inestabilidad genómica y mutaciones, eventos que facilitan la progresión oncogénica (Chen et al., 2007; Hellner et al., 2009; McLaughlin-Drubin & Münger, 2009; Mesri et al., 2014; Zwerschke et al., 1999).

Generalmente, el grado de integración viral aumenta progresivamente a medida que las lesiones cervicales progresan hacia cáncer invasivo. El hecho de que VPH esté integrado le impide formar un genoma circular completo que pueda empaquetarse y transmitirse a un nuevo hospedador. Por esta razón, mientras los genes tardíos, como L1, disminuyen exageradamente su expresión, los oncogenes E6 y E7 están totalmente desregulados (Figura 1) (Doorbar et al., 2015). De esta manera, la ausencia de L1 y el incremento de E7 pueden ser marcadores para la predicción de CCU (Arafa et al., 2008; Bin et al., 2013).

Figura 1.

Progresión de lesiones intraepiteliales cervicales



Nota: La infección por VPH-AR puede conducir al desarrollo de una lesión cervical como NIC-1. Ocasionalmente, la infección puede provocar una neoplasia de grado superior, con una desregulación de la expresión génica viral que induce cambios genéticos y la posible integración del genoma viral en la célula hospedadora. Tomada de: Doorbar J, Egawa N, Griffin H, Kranjec C, Murakami I. Human papillomavirus molecular biology and disease association. Rev Med Virol [Internet]. 2015 Mar [cited 2018 May 26];25:2–23. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.1822> (Doorbar et al., 2015).

Estudios comparativos entre PCR con cebadores consenso de L1 (MY09/11) y PCR con cebadores específicos de genotipo E6/E7 evidenciaron que el 10,9% de las infecciones por VPH-AR no son detectadas por PCR de L1, mientras que por PCR de E6/E7 sí es posible (Depuydt et al., 2007). Asimismo, se ha encontrado que particularmente el ensayo con L1 omite el 8,3% de las infecciones por VPH-16 y el 27,9% de infecciones por VPH-18 (Tjalma & Depuydt, 2013).

En un estudio de lesiones cervicales de alto grado se calculó la frecuencia de falsos negativos utilizando cebadores de la región L1 en comparación con el empleo de cebadores específicos para las regiones E6/E7. Los resultados mostraron que en las infecciones por VPH-16 el 0,3% de las NIC-2 y el 3,94% de NIC-3 fueron negativas por L1 y positivas por E6/E7 (Roberts et al., 2006).

Otros estudios han determinado que la sensibilidad relativa (SR) de la PCR con cebadores consenso MY09/11 fue de 80,7% (180/223) y la SR de la PCR específica de genotipo fue de 97,8% (218/223). En este caso la frecuencia de falsos negativos para la PCR con cebadores consenso de L1 fue de 17,4% en infecciones únicas, 23,3% en infecciones múltiples y 34,6% en infecciones múltiples que contenían tres o más tipos de VPH. Estos datos sugieren que la PCR con cebadores consenso puede conducir a una pérdida significativa de detección de casos mientras que la PCR con cebadores específicos puede proporcionar resultados más precisos y confiables, pues reducen la competencia para la amplificación del ADN cuando hay múltiples infecciones por VPH, mejorando notablemente la especificidad y sensibilidad del ensayo (Şahiner et al., 2014).

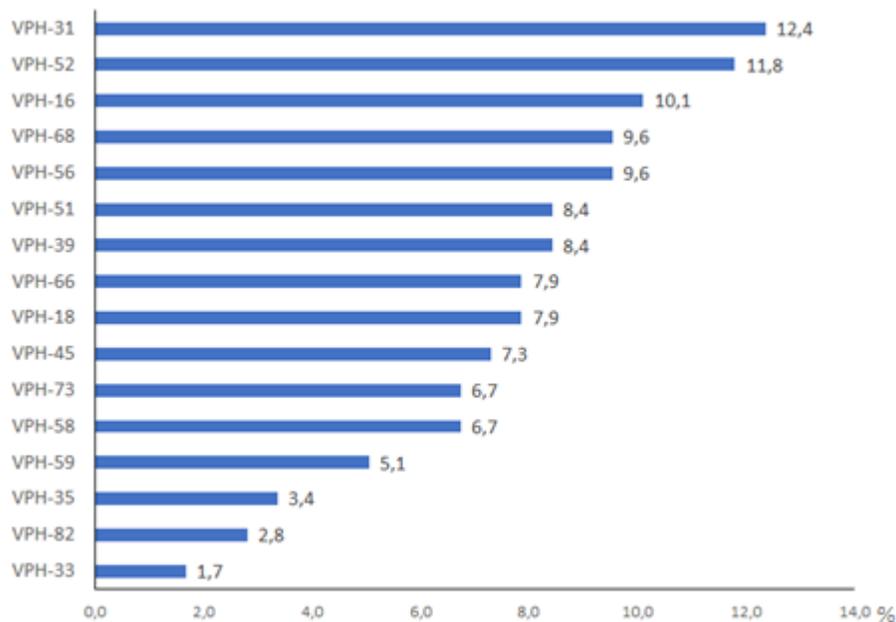
Es de resaltar que estos protocolos en su mayoría amplifican los genes E6 o E7, sin embargo, se ha encontrado que E6 es más polimórfico y tiene más variantes intratípicas que difieren en el

potencial oncogénico y en la distribución geográfica (Hao et al., 2010; Yamada et al., 1997). Además, los genotipos de alto riesgo que se detectan en algunos de estos estudios no son todos los que se consideran actualmente según la IARC. Algunos de estos estudios incluyen solo los genotipos de VPH-AR más prevalentes en el mundo. No obstante, el comportamiento de la infección por VPH en Bucaramanga es más diverso, todos los genotipos de alto riesgo están circulando y tienen diferentes prevalencias de infección (Figura 2) (Torrado et al., 2018). Finalmente, muchos de estos son ensayos individuales, detectan cada genotipo por aparte, eso implica hacer 14 PCRs para cada muestra de una paciente. A pesar de que actualmente existen ensayos multiplex de genotipificación de VPH, estos utilizan tecnologías más costosas y de muy difícil acceso en nuestro país, como es el caso de la tecnología luminex. Por esto es importante desarrollar una herramienta diagnóstica sensible, accesible y de alto rendimiento que genotipifique todos los VPH-AR.

Recientemente, en nuestro grupo de investigación hemos realizado una prueba de concepto de una PCR multiplex de E7 para detectar 6 genotipos de VPH-AR. Los resultados discordantes entre la PCR de L1 y la de E7 permitieron detectar un 15,8% de falsos negativos por parte de la PCR de L1 (Peña-López et al., 2018). Adicional a las implicaciones en detección de casos, la discordancia entre estos dos métodos podría proporcionar información acerca de la integración de VPH-AR en el genoma de la célula hospedadora, lo cual es de gran importancia dado que se ha demostrado que la integración viral produce alteraciones en vías con potencial oncogénico. Es decir, puede generar mutaciones conductoras de la carcinogénesis cervical, y además promover la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Bodelon et al., 2016; Liu et al., 2016; Melsheimer et al., 2004).

Figura 2.

Frecuencia de los genotipos de VPH detectados en mujeres entre los 35 y 65 años residentes en Bucaramanga, 2016 a 2018.



Debido a que esta qPCR multiplex de E7 se realizó en una muestra pequeña de pacientes, es posible que la detección de infección por VPH-AR se modifique si se aplica a mayor escala, se amplía la cobertura a 14 genotipos de VPH-AR y se traslada a una plataforma de alto desempeño como lo es la qPCR. Esta técnica basada en la determinación cuantitativa de ADN es particularmente específica y sensible. Sin embargo, generalmente, el método de detección se basa en intercalar la doble cadena de ADN con agentes fluorescentes, pudiendo darse resultados falsos positivos debido a productos de PCR inespecíficos y dímeros de cebadores (Costa, 2004). Con el fin de evitar esto, se han diseñado sondas fluorescentes como las sondas Taqman, cuya principal ventaja es hibridar únicamente en la secuencia diana del ADN. Estas sondas son específicas de los

productos de PCR, en su secuencia tienen un fluoróforo reportero en el extremo 5´ y un extintor de fluorescencia en el extremo 3´, estas moléculas se hidrolizan una vez actúa la Taq polimerasa, permitiendo la emisión de fluorescencia (Didenko, 2001; Navarro et al., 2015).

Por todo lo anterior, la PCR multiplex en tiempo real del oncogén E7 utilizando sondas Taqman que se estandarizó en el presente estudio, se espera que permita hacer un diagnóstico temprano más sensible y específico, y que genere un impacto clínico y epidemiológico mayor. Además, este ensayo tendrá potencial aplicabilidad en la estratificación del riesgo, en la determinación de la persistencia de infección por VPH-AR y en el control y seguimiento post-tratamiento.

3. Método

3.1 Tipo de investigación.

Estudio Fase I de evaluación de tecnología diagnóstica: Estandarización de la prueba PCR multiplex en tiempo real del oncogén E7 para genotipificación de 14 VPH-AR.

3.2 Para la resolución del objetivo específico 1.

Para aislar y clonar los ORFs de E7 de los 14 genotipos de VPH-AR que se utilizaron como gen blanco en la qPCR multiplex del oncogén E7 se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

3.2.1. Selección de muestras cervicales.

Las muestras necesarias para la clonación del oncogén E7 se obtuvieron del banco de muestras recolectadas en proyectos externos e internos de nuestro grupo de investigación, las

cuales fueron tomadas mediante cepillado cervical de mujeres residentes de la zona norte de Bucaramanga por medio de un dispositivo para autotoma según el procedimiento y los criterios de inclusión y exclusión descritos previamente (Torrado et al., 2018). Se seleccionaron 14 muestras con infección única para cada uno de los genotipos de VPH-AR analizadas previamente por amplificación multiplex del gen L1 por PCR con subsecuente hibridación reversa con la técnica HPV Direct Flow CHIP.

3.2.2. Extracción de ADN.

Se tomaron 1000 μL de muestra, se centrifugó a 3.500 rpm por 8 minutos y se descartó el sobrenadante, posteriormente se agregaron 400 μL de PBS, se centrifugó a 3.000 rpm por 5 min y de nuevo se descartó el sobrenadante. Consecutivamente, se añadieron 600 μL de WCLB (10mM Tris-Cl pH 7,5, 10 mM EDTA pH 8,0 50mM NaCl), 10 μL de SDS 10% y se mezcló con vórtex. Se incubó a 56°C por 1 hora a 300 rpm hasta que se observó la digestión completa de las células, se agitó en vórtex cada 15 minutos. Seguidamente, se adicionaron 150 μL de Cloruro de sodio 6M y se dio vórtex por 30 segundos. Luego se incubó 5 minutos en frío para ayudar a la precipitación de proteínas y se centrifugó a 13.000 rpm por 10 min.

Se transfirió el sobrenadante a un nuevo vial con cuidado de no remover el precipitado. A continuación, se añadió al sobrenadante 750 μL de Isopropanol (-20°C), se mezcló por inversión durante 1 minuto hasta apreciar la aparición de la malla de ADN y se centrifugó a 13.000 rpm por 6 min. Se eliminó el sobrenadante por inversión con cuidado de no eliminar el precipitado. En seguida se lavó con 200 μL de Etanol al 70%, se centrifugó como se hizo anteriormente, se eliminó el sobrenadante por inversión y se retiró el exceso de etanol poniendo el vial boca abajo en una

toalla de papel limpia. Se secó en bloque seco a 40°C, se resuspendió en 50 µL de buffer TE pH 7,5 estéril y se incubó a 65°C por una hora a 300 rpm. Posteriormente, se dio vórtex y spin y se determinó la concentración y el radio de absorbancia a 260/280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific (Massachusetts, USA). Finalmente, se conservó el ADN a -20°C.

3.2.3. Control de extracción de ADN.

Se amplificó un fragmento de 250 pb del gen de β-actina humana y se corrió una electroforesis en gel de agarosa.

3.2.4. Diseño de cebadores específicos para los ORFs de E6/E7.

Se diseñaron cebadores dirigidos hacia el ORF de E7 de cada uno de los 14 genotipos de VPH-AR utilizando la herramienta Primer-blast. Por medio del programa AutoDimer se verificó que no se forman estructuras secundarias de cebadores.

3.2.5. Amplificación de los ORFs de E6/E7.

Se utilizó la PCR Master Mix DreamTaq Green, 2X de Thermo Scientific (Massachusetts, USA) para realizar las amplificaciones de los ORF de E7 de los 14 genotipos de VPH-AR. La mezcla para la PCR tuvo un volumen final de 20 µl como se muestra en la tabla 1. En los casos necesarios se modificaron las concentraciones de ADN (50 a 250 ng), cebadores (0,33 a 1,00 µM) y DMSO (0 a 3%). Se utilizó el termociclador T100 de Bio-Rad (California, USA), siguiendo el programa de amplificación descrito en la tabla 2.

Tabla 1*Componentes de la reacción de amplificación de los ORFs de E6/E7*

| Componente PCR | | Concentración | Volumen |
|----------------|-------------------|---------------|------------|
| Master Mix | dNTPs | 0,2 mM | |
| DreamTaq | Taq polimerasa | 5 u | 10 uL |
| Green, 2X | MgCl ₂ | 1,5 mM | |
| DMSO | | 0-3% | 0-0,6 uL |
| Cebadores | | 1 uM | 2,0 uL |
| Agua | | - | 3,4-4,0 uL |
| ADN | | 200 ng | 4 uL |
| Volumen final | | - | 20 uL |

Tabla 2.*Programa de amplificación de los ORFs de E6/E7*

| Programa PCR ORF E6/E7 | | | |
|------------------------|---------------------------|---------|-------------|
| 1 ciclo | Desnaturalización inicial | 95°C | 2 minutos |
| 35 -40 ciclos | Desnaturalización | 95°C | 15 segundos |
| | Alineamiento | 58-62°C | 20 segundos |
| | Extensión | 72°C | 1 minuto |
| 1 ciclo | Extensión final | 72°C | 7 minutos |
| | Conservación | 4°C | ∞ |

3.2.6. Electroforesis en gel de agarosa.

Se utilizó un sistema de electroforesis horizontal Mini- Sub® Cell GT y la fuente de alimentación básica PowerPac de Bio-Rad (California, USA). Se corrieron 15 uL de los productos

de amplificación en un gel con concentración de agarosa al 2,0%, a 60 voltios de potencia durante 1 hora. Se utilizó el patrón de peso molecular de 100 pb de Promega (Madison, WI USA) y para visualizar el ADN se tiñó el gel con HydraGreen de ACTGene (Nueva Jersey, USA). Los 5 uL restantes de los productos amplificados se conservaron a -20°C. Posteriormente, se observó la separación de los fragmentos de ADN en el fotodocumentador GelDoc XR+ de Bio-Rad (California, USA) con luz ultravioleta a 260 nm y se guardó evidencia fotográfica.

3.2.7. Células competentes.

Se prepararon células competentes de *Escherichia coli* TOP10F mediante incubación con CaCl₂ de la siguiente manera: se inocularon 200 uL de un precultivo en 100 mL de SOB y se dejó crecer a 37°C en agitación hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,4 a 0,6. Las células se colectaron mediante centrifugación a 3.000 rpm a 4 °C durante 10 min, el sobrenadante se descartó y la biomasa bacteriana se resuspendió en 16 mL de CCMB80 previamente enfriado. La suspensión se dispuso en baño de hielo durante 20 min y las células fueron nuevamente colectadas por centrifugación a 3.000 rpm durante 10 min. Luego de eliminar el sobrenadante, el precipitado celular se resuspendió en 2,5 mL de CCMB800. La densidad óptica a 600 nm estuvo entre 0,9 y 1,0. Finalmente, se hicieron alicuotas de 50 µL y se conservaron a -70 °C.

3.2.8. Ensayo de competitividad.

Se transformaron las bacterias competentes por choque térmico a 42 °C por un minuto con diferentes concentraciones de un plásmido conocido con el gen de resistencia a la ampicilina. Luego de su recuperación en caldo SOB a 37 °C durante una hora, se sembraron las células transformadas con las diferentes concentraciones del plásmido y un control negativo (sin ADN)

en agar Luria Bertani-LB con ampicilina (50 ug/mL). Se incubó a 37°C durante 14 horas y se calculó la eficiencia de transformación (ET) de las células competentes usando la siguiente fórmula:

$$ET = \frac{\text{UFC}}{\mu\text{gADN plasmídico}} \times \frac{\text{Volumen final}}{\text{Volumen sembrado}} = \text{UFC}/\mu\text{g de plásmido}$$

3.2.9. Clonación del ORF de E6/E7.

Se utilizó el kit de clonación de NEB (Massachusetts, USA) según las especificaciones del fabricante para todos los genotipos de VPH-AR, excepto para los genotipos VPH-45 y -51, para los cuales se usó el kit TOPO TA Cloning de Thermo Fisher Scientific (Massachusetts, USA).

Posteriormente, se transformaron las bacterias competentes TOP10F por choque térmico y se seleccionaron 5-10 colonias transformantes las cuales se dejaron creciendo en 5 mL de caldo Luria Bertani-LB con ampicilina (50 ug/mL) a 37°C y en agitación durante la noche. A estas mismas colonias se les hizo una extracción de ADN para verificar la presencia del vector con el ORF de E7 por medio de PCR utilizando el programa antes mencionado.

3.2.10. Extracción de ADN plasmídico.

Se realizó una miniprep utilizando el kit Invisorb® Spin Plasmid Mini Two de Invitex molecular (Berlín, Alemania) a partir de 2 mL de suspensión bacteriana según las indicaciones del fabricante. Se cuantificó la concentración de ADN plasmídico y el radio de absorbancia a 260/280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific (Massachusetts, USA).

3.2.11. Control de extracción de ADN plasmídico.

Se hizo una digestión del plásmido pMinit 2.0 + ORF de E7 con la enzima de restricción EcoRI de New England Biolabs (Massachusetts, USA), durante 20 minutos a 37 °C. Luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con HydraGreen ACTGene (Nueva Jersey, USA) y se visualizó el ADN en el fotodocumentador GelDoc XR+ de Bio-Rad (California, USA). Posteriormente, se confirmó por PCR punto final la ligación del inserto para demostrar que podía ser usado como ADN blanco para la amplificación por qPCR.

3.2.12. Secuenciación del ORF de E6/E7.

Para corroborar las identidades de los amplicones obtenidos, se secuenciaron por el método de Sanger empleando el servicio ofrecido por Macrogen (Korea, Seúl). Para el análisis de clonación se utilizaron los siguientes cebadores:

Cebador directo: 5' ACCTGCCAACCAAAGCGAGAAC 3'

Cebador inverso: 5' TCAGGGTTATTGTCTCATGAGCG 3'

3.3. Para la resolución del objetivo específico 2.

Para la estandarización de las cuatro qPCR multiplex del oncogén E7 para la detección de 14 genotipos de VPH-AR se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

3.3.1. Diseño de cebadores y sondas Taqman.

Se diseñaron sondas y cebadores para el oncogén E7 de los 14 genotipos de VPH-AR y para el gen de la beta tubulina humana utilizando la herramienta Primer-blast. Se tuvo en cuenta su alineamiento con secuencias consignadas en el GenBank y se analizaron los resultados mediante

la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se seleccionó la opción con mejores características de temperatura de fusión, estabilidad y porcentaje de GC en los cebadores.

Para la qPCR se utilizó el termociclador CFX96 de 5 canales marca Bio-Rad (California, USA), por lo tanto, se armaron reacciones de amplificación de cuatro multiplex cada una con una sonda específica y un par de cebadores para el gen de la Beta tubulina y cuatro pares de cebadores con sus respectivas sondas para cuatro genotipos de VPH-AR como se describe en la tabla 3. Se escogieron los fluoróforos y extintores recomendados por la casa comercial según los picos en el espectro de emisión, la intensidad de fluorescencia y los filtros ópticos utilizados por la máquina de PCR en tiempo real seleccionada.

Tabla 3.

Disposición de las cuatro pruebas multiplex para la detección de los 14 genotipos de VPH-AR

| Multiplex | Genotipos de VPH-AR |
|------------------|--------------------------------------|
| 1 | VPH-16, -18, -31, -33, beta-tubulina |
| 2 | VPH-35, -39, -45, -51, beta-tubulina |
| 3 | VPH-52, -56, -58, -59, beta-tubulina |
| 4 | VPH-68, -73, beta-tubulina |

3.3.2. Construcción de curvas estándar.

El ADN plasmídico se utilizó para los controles positivos de la técnica qPCR y para determinar la sensibilidad analítica de la misma. Las curvas estándar se construyeron a partir de un ciclo umbral (threshold cycle, ct) con 6 o 7 diluciones de los plásmidos de cada genotipo, de 10^6 o 10^7 a 10^1 . El número de copias del gen por μL para las diluciones de ADN plasmídico se estimó mediante la siguiente fórmula (Whelan et al., 2003).

$$\text{Número de copias del gen} = \frac{[\text{plásmido ng}/\mu\text{L}] \times 6,022 \times 10^{23} \text{ moléculas/mol}}{\# \text{pb plásmido} \times 650 \text{ g/mol} \times 1 \times 10^9 \text{ ng/g}}$$

Con los valores calculados de estos estándares se linealizó la curva creando una gráfica de los ciclos umbrales contra el logaritmo de las concentraciones. Con la recta generada se calculó la pendiente (m), y con esta pendiente se calculó la eficiencia de la reacción ($E=10^{-1/m}$). El número de moléculas amplificadas se obtuvo despejando la ecuación de la recta:

$$Y = mX + B \rightarrow X = Y - B / m$$

Donde:

X = Logaritmo de la concentración de ADN inicial

Y = Ciclo umbral

B = Intersección en Y

m = Pendiente

La eficiencia de la reacción permitió calcular la concentración inicial en número de copias de cada genotipo de VPH-AR por nanogramos de ADN al despejar la fórmula:

$$N = N_0 \times E^n \rightarrow N_0 = N / E^n$$

Donde:

N = Moléculas amplificadas

N₀ = Moléculas iniciales

E = Eficiencia

n = Número de ciclos

3.3.3. Optimización de las condiciones de la qPCR.

Para optimizar las condiciones de la qPCR, primero se utilizó un sistema convencional comercial EvaGreen 2X qPCR de Bio-Rad (California, USA) con Taq Polimerasa con Sso7d, dinucleótidos trifosfatos (dNTPs) y cloruro de magnesio (MgCl₂). Se probaron individualmente los plásmidos con los diferentes genotipos de VPH-AR utilizando diferentes temperaturas de amplificación, número de ciclos y concentraciones de cebadores. Una vez optimizadas estas condiciones, se utilizó la IQ Multiplex Powermix de Bio-Rad (California, USA) para la detección de 5 objetivos en un solo tubo (4 genotipos de VPH-AR y el gen de la beta tubulina humana). Se probaron diferentes parámetros, incluyendo un ciclo previo de digestión enzimática y diferentes concentraciones de cebadores y sondas Taqman. La especificidad de los cebadores se probó determinando la capacidad que tuvieron de discriminar entre plásmidos de diferentes genotipos.

Para imitar el entorno complejo presente al amplificar ADN genómico se agregaron 30 ng de ADN humano femenino de una muestra de sangre, de tal manera que en cada multiplex se incluyó un control positivo de Beta tubulina humana. Uno de los controles negativos incluyó todos

los componentes de la PCR sin ADN plantilla y el segundo control negativo incluyó el vector de clonación vacío.

La amplificación, la detección de la señal y el análisis de datos se realizaron en el equipo CFX96 de Bio-Rad (California, USA) utilizando el software CFX Maestro.

3.3.4. PCR digital en gotas (ddPCR).

Para verificar las concentraciones de E7 en los estándares utilizados en la qPCR multiplex de E7 se utilizó la ddPCR. Inicialmente, se linealizaron 500 ng de los plásmidos de cada genotipo usando la enzima de restricción EcoRI y se realizaron las diluciones como se mencionó anteriormente. La ddPCR se llevó a cabo utilizando el sistema de PCR digital en gotas QX200 de Bio-Rad (California, USA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los ensayos se realizaron en un volumen total de 24 μ l. La mezcla de reacción contuvo 12 μ l de Supermix ddPCR para EvaGreen 2X, 1,2 μ l de cebadores para una concentración final de 125 nM, 5,8 μ l de agua y 5 μ l de la dilución 10^3 . Se cargaron 20 μ l de la mezcla de reacción, se tomaron 70 μ l de aceite generador de gotas en los pocillos del cartucho DG8 y se colocaron en el generador de gotas QX200. Se transfirieron 40 μ l de las gotas generadas a una placa de PCR de 96 pocillos, que luego se selló térmicamente con aluminio en un sellador de placas de PCR PX1 de Bio-Rad (California, USA) y se colocó en el termociclador C1000 de Bio-Rad (California, USA).

Las condiciones de amplificación fueron: activación enzimática a 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos de un perfil térmico de dos pasos a 95°C durante 30 segundos y 57°C durante

1 minuto, finalmente 4° C durante 5 minutos, 95°C por 5 minutos y conservación a 4°C. Durante todos los pasos se mantuvo una velocidad de rampa de 2°C/segundo. Después del ciclo térmico, la placa de 96 pocillos se colocó en el lector de gotas QX200, donde se leyeron y analizaron las gotas utilizando el software QuantaSoft (1.7.4.0917).

Posteriormente, se normalizaron las concentraciones de los estándares teniendo en cuenta los resultados en copias/ μ L de la ddPCR y se realizaron nuevamente las curvas estándar. Adicionalmente, se probaron las cuatro multiplex con DNA extraído de muestras cervicovaginales de mujeres. Se seleccionó una muestra positiva para cada genotipo (por PCR de L1) y se hicieron cuatro grupos teniendo en cuenta la conformación de las multiplex. Se utilizaron 4 ng de ADN de cada muestra, para un total de 25 ng en la reacción.

4. Resultados

4.1. Aislamiento y clonación de los ORFs de E7 de los 14 genotipos de VPH-AR para ser utilizados como gen blanco en la qPCR multiplex del oncogén E7.

4.1.1. Características de las muestras cervicales seleccionadas, del ADN extraído y del control de extracción.

Las muestras de pacientes con infección única para cada genotipo de VPH-AR fueron seleccionadas a partir de la base de datos del proyecto financiado por Colciencias con código COL-110272553474. Tras extraer su ADN se obtuvieron concentraciones por encima de 50 ng/ μ L para

todas las muestras, excepto para aquellas con los genotipos VPH-59 y VPH-68 (Tabla 4). Por otra parte, las mediciones de los radios de absorbancia a 260/280 nm estuvieron por encima de 1,9 y el radio a 260/230 nm entre 1,8 y 2,2, indicando un grado de pureza óptimo.

Al amplificar un fragmento de 250 pb del gen de β -actina humana todas las muestras fueron positivas para este gen (datos no mostrados), confirmando una correcta extracción de ADN y la ausencia de inhibidores de la PCR en las muestras.

Tabla 4.

Muestras cervicales seleccionadas por genotipo y características del ADN extraído.

| Genotipo VPH-AR | ID Muestra | Concentración de ADN (ng/ μ L) | Radio 260/280 nm |
|-----------------|------------|------------------------------------|------------------|
| 16 | 7700101799 | 222,9 | 1,96 |
| 18 | 7700101078 | 105,9 | 1,98 |
| 31 | 7700101602 | 421,8 | 1,99 |
| 33 | 7700101809 | 251 | 1,97 |
| 35 | 7700101020 | 53 | 1,99 |
| 39 | 7700101660 | 136 | 1,96 |
| 45 | 7700101441 | 1133,8 | 1,95 |
| 51 | 7700101026 | 345,2 | 1,98 |
| 52 | 7700101495 | 83,8 | 1,96 |
| 56 | 7700101786 | 226,6 | 1,94 |
| 58 | 7700101411 | 200,7 | 1,97 |
| 59 | 7700100583 | 33,9 | 1,99 |
| 68 | 7700101369 | 38,7 | 1,98 |
| 73 | 7700101393 | 189,1 | 1,98 |

4.1.2. Cebadores específicos diseñados para los ORFs de E6/E7 de cada VPH-AR.

Los cebadores diseñados para amplificar los genes E6/E7 de VPH-AR tuvieron una longitud variable según el genotipo (entre 742 y 815 pb) teniendo en cuenta los genes de referencia consignados en el GenBank, temperaturas de melting entre 38 y 60 °C y porcentajes de GC entre 60 y 65% (Tabla 5).

Tabla 5.

Características de los cebadores específicos para los ORFs de E6/E7 de cada VPH-AR.

| Nombre | Número de acceso en GenBank | Cebador | Secuencia (5'→3') | T _m °C | GC% | Longitud |
|--------|-----------------------------|---------|----------------------------|-------------------|-------|----------|
| VPH-16 | K02718 | Directo | ATGCACCAAAAGAGAACTGCAATGT | 40.00 | 62.19 | 776 |
| | | Inverso | TTATGGTTTCTGAGAACAGATGGGGC | 46.15 | 62.99 | |
| VPH-18 | GQ180792.1 | Directo | ATGGCGCGCTTTGAGGATCCA | 57.14 | 65.10 | 803 |
| | | Inverso | TTACTGCTGGGATGCACACCAC | 54.55 | 63.09 | |
| VPH-31 | J04353 | Directo | ATGTTCAAAAATCCTGCAGAAAGACC | 38.46 | 60.74 | 749 |
| | | Inverso | TTACAGTCTAGTAGAACAGTTGGGGC | 46.15 | 61.97 | |
| VPH-33 | M12732 | Directo | ATGTTTCAAGACACTGAGGAAAACC | 38.46 | 60.41 | 758 |
| | | Inverso | TTATTGTTGTGCACAGGTAGGGCA | 45.83 | 62.81 | |
| VPH-35 | M74117 | Directo | ATGTTTCAGGACCCAGCTGAAC | 50.00 | 60.82 | 752 |
| | | Inverso | TTATGCTCTCTGTGAACAGCCG | 50.00 | 60.68 | |
| VPH-39 | M62849 | Directo | ATGGCGCGATTTACAATCCTG | 50.00 | 62.14 | 815 |
| | | Inverso | TTACTGGTTTGCAGTTGCACAC | 45.45 | 60.16 | |
| VPH-45 | X74479 | Directo | ATGGCGCGCTTTGACGAT | 55.56 | 60.82 | 806 |
| | | Inverso | TTATTGGTTAGTTGCACACCACGG | 45.83 | 61.81 | |
| VPH-51 | NC_001533.1 | Directo | ATGTTCGAAGACAAGAGGGAAAGAC | 44.00 | 61.03 | 769 |
| | | Inverso | CTAGTTGTTCGCACAACACGG | 52.38 | 60.07 | |
| VPH-52 | LC373207.1 | Directo | ATGTTTGAGGATCCAGCAACACG | 47.83 | 61.67 | 751 |
| | | Inverso | TTATAGCCGTGCACAGCCGG | 60.00 | 62.92 | |
| VPH-56 | KX514418.1 | Directo | ATGGAGCCACAATTCAACAATCCA | 41.67 | 61.30 | 788 |
| | | Inverso | TTAGTTACTTGATGCGCAGAGTGG | 45.83 | 61.15 | |
| VPH-58 | KY225967.1 | Directo | ATGTTCCAGGACGCAGAGGAGA | 54.55 | 63.14 | 761 |

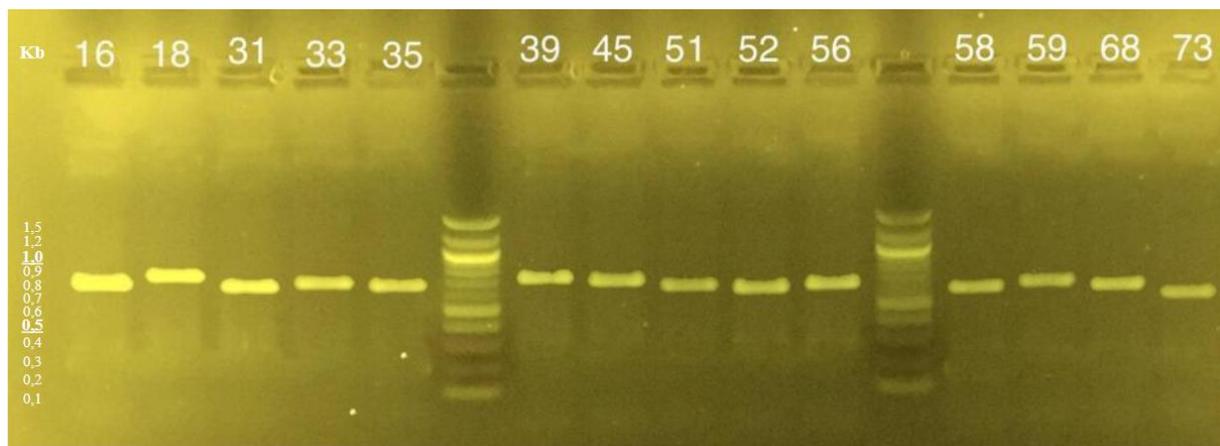
| | | | | | | |
|--------|------------|---------|----------------------------|-------|-------|-----|
| | | Inverso | TTATTGCTGTGCACAGCTAGGGC | 52.17 | 63.60 | |
| VPH-59 | KC470266.1 | Directo | ATGGCAGCTTTGAGGATCCTAC | 52.17 | 62.86 | 811 |
| | | Inverso | TTACTGGTTTGCTGCACACAAAGG | 45.83 | 62.46 | |
| VPH-68 | KX514431.1 | Directo | TCACAACCCTGAGGAACGGC | 60.00 | 62.39 | 805 |
| | | Inverso | TTACTGGGTTTCCGTTGCACACC | 52.17 | 63.66 | |
| VPH-73 | X94165 | Directo | ATGCTGTTTCCCAATTCAGAAGAAC | 40.00 | 60.28 | 742 |
| | | Inverso | TTATAGGTTTCTGGAACAGTTGGGGC | 46.15 | 62.94 | |

4.1.3. Amplificación de los ORFs de E6/E7 de cada VPH-AR.

A partir de las muestras seleccionadas positivas para cada uno de los genotipos de VPH-AR se obtuvieron amplificaciones específicas de los ORF E6/E7 de los 14 genotipos de VPH-AR (Figura 3).

Figura 3.

Amplificación de los ORFs de E6/E7 de cada VPH-AR.



Nota: Carriles 1-5: bandas correspondientes a los ORF de E6/E7 de los genotipos VPH-16 (776 pb), VPH-18 (803 pb), VPH-31 (749 pb), VPH-33 (758 pb) y VPH-35 (752 pb); Carril 6 y 12: marcador de peso molecular; Carriles 7-11: Bandas correspondientes a los genotipos VPH-39 (815 pb), VPH-45 (806 pb), VPH-51 (769 pb), VPH-52 (751 pb) y VPH-56 (788 pb); Carriles 13-16: VPH-58 (761 pb), VPH-59 (811 pb), VPH-68 (805 pb) y VPH-73 (742 pb).

4.1.4. Ensayo de competitividad.

Se calculó una eficiencia de transformación de las células competentes de 5×10^3 transformantes por microgramo de ADN plasmídico.

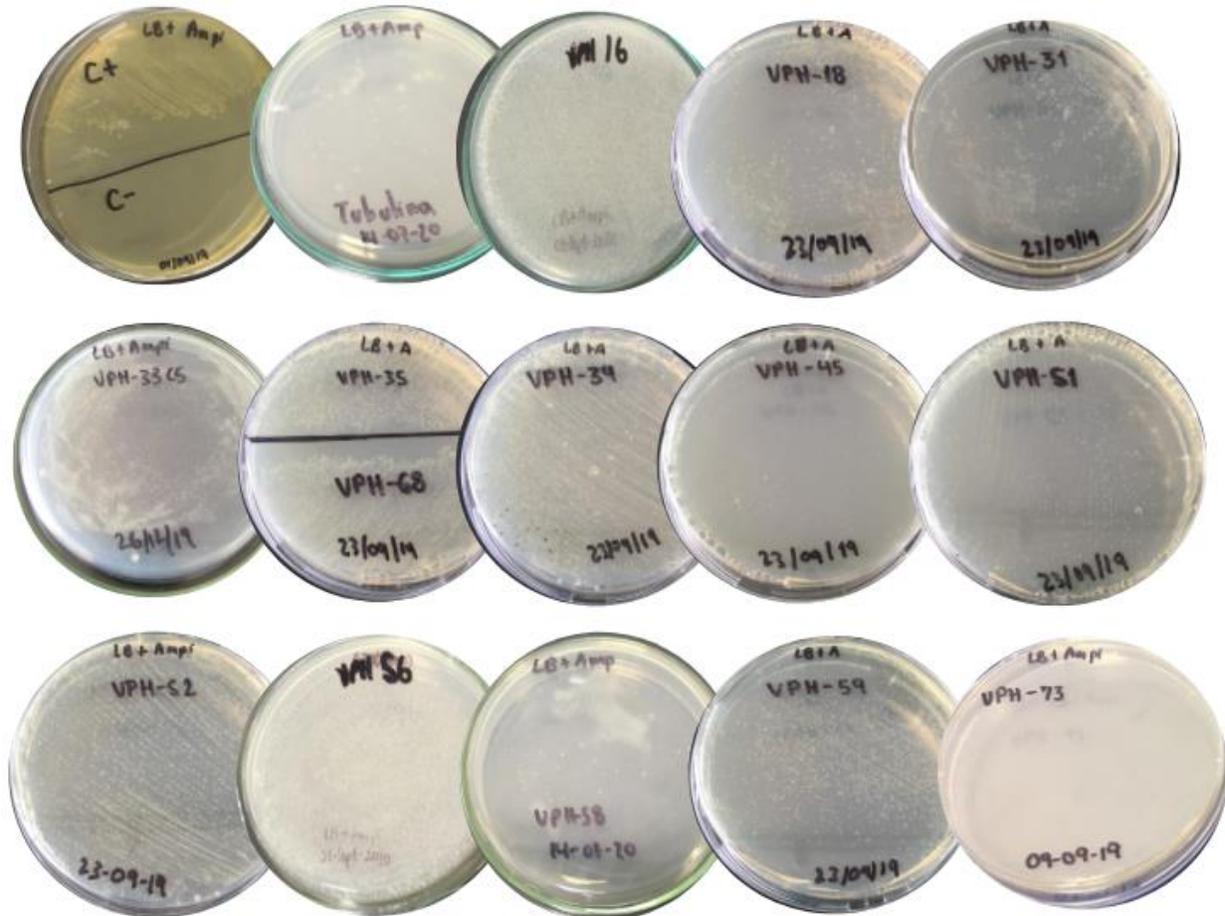
4.1.5. Clonación del ORF de E6/E7 para cada VPH-AR

La mayoría de los ORF de E6/E7 se ligaron en el vector pMinit 2.0, excepto VPH-45 y -51 que se ligaron en el vector TOPO TA. Se transformaron las bacterias competentes (Figura 4), y al confirmar la clonación mediante digestión enzimática esto dio como resultado bandas entre 800 y 900 pb correspondientes a los ORF E6/E7 y bandas entre 2500 pb (pMinit 2,0) y 4000 pb (TOPO TA) de acuerdo con el vector de clonación (Figura 5). La ausencia del sitio de restricción dentro de todos los insertos de los plásmidos fue verificada por la herramienta Genome Compiler.

Posteriormente, al probar los plásmidos ligados realizando una amplificación con los cebadores dirigidos a E7 específicos de genotipo en una PCR punto final, se obtuvieron productos específicos de los 14 genotipos de VPH-AR (Figura 6). Finalmente, los resultados de la secuenciación de los plásmidos por el método de Sanger (en ambos sentidos) mostraron un porcentaje de identidad del 99% para cada uno de estos genotipos (Tabla 6).

Figura 4.

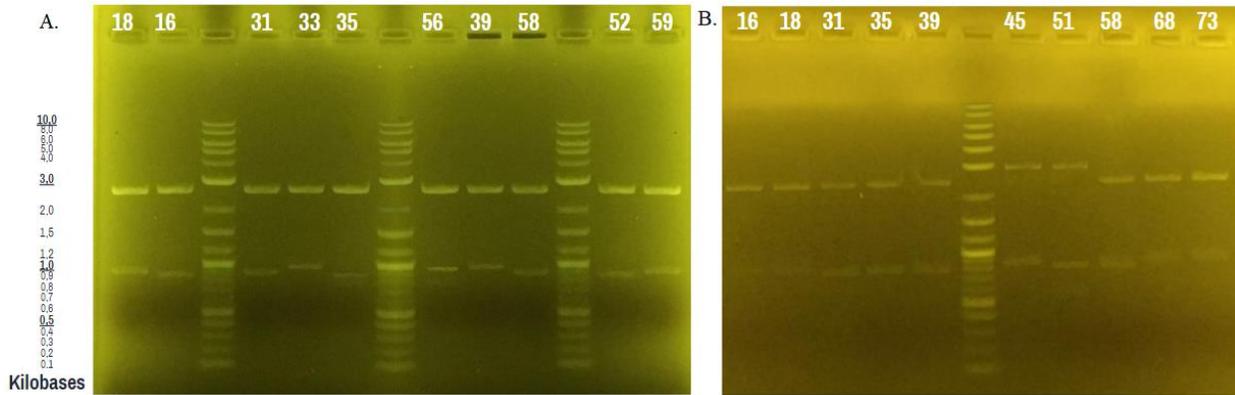
Transformación de células competentes con ORF E6/E7 de cada VPH-AR



Nota: De izquierda a derecha. Fila 1: Control positivo (arriba) y negativo (abajo) de transformación; bacterias transformantes con un fragmento del gen de beta tubulina; transformantes con ORF E6/E7 de VPH-16; transformantes con ORF E6/E7 de VPH-18 y transformantes con ORF E6/E7 de VPH-31. Fila 2: transformantes con ORF E6/E7 de VPH-33; transformantes con ORF E6/E7 de VPH-35 (arriba) y VPG-68 (abajo); transformantes con ORF E6/E7 de VPH-39; transformantes con ORF E6/E7 de VPH-45 y transformantes con ORF E6/E7 de VPH-51. Fila 3: transformantes con ORF E6/E7 de VPH-52; transformantes con ORF E6/E7 de VPH-56; transformantes con ORF E6/E7 de VPH-58; transformantes con ORF E6/E7 de VPH-59 y transformantes con ORF E6/E7 de VPH-73.

Figura 5.

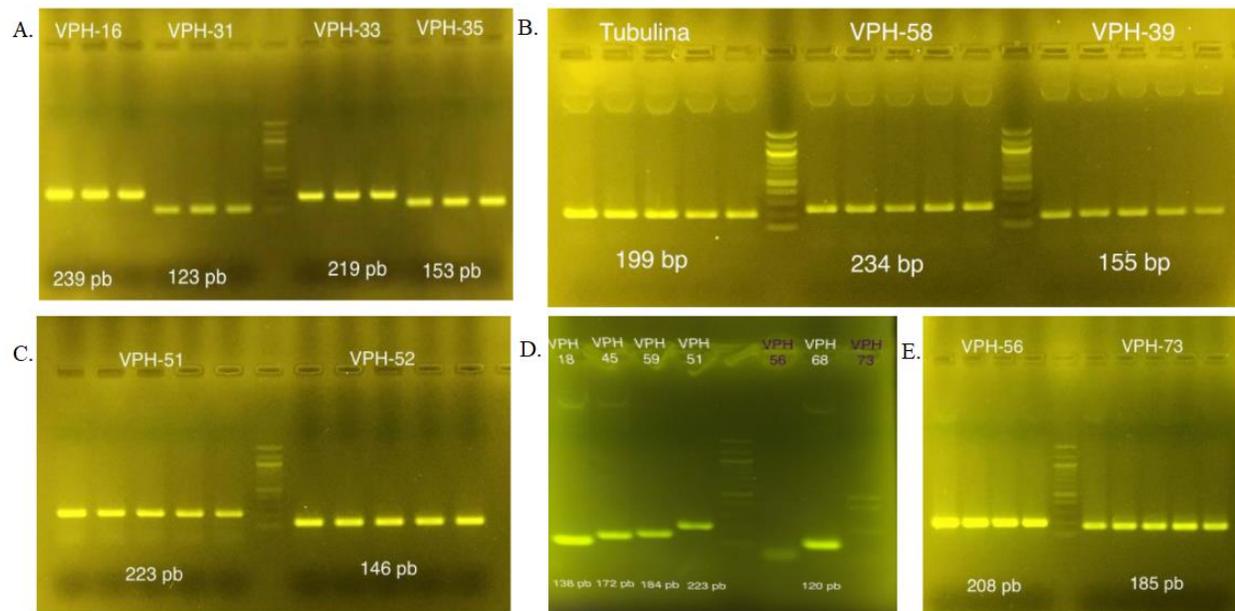
Confirmación de la clonación del ORF E6/E7 de cada VPH-AR: Digestión enzimática.



Nota: Bandas correspondientes a los ORF E6/E7 de VPH-AR (~800 pb) y al vector de clonación (2500 o 4000 pb). **A.** Carriles 1-2: VPH-18 y -16; carriles 3, 7 y 11: marcador de peso molecular; carriles 4-6: VPH-31, -33 y -35; carriles 8-10: VPH-56, -39 y -58; carriles 12-13: VPH-52 y -59. **B.** Carriles 1-5: VPH-16,-18,-31,-35 y -39; carril 6: marcador de peso molecular; carriles 7-11: VPH-45,-51,-58,-68 y -73.

Figura 6.

Confirmación de clonación: Amplificación de un fragmento del ORF E7 de cada VPH-AR.



Nota: **A.** Carriles 1-3: VPH-16; Carriles 4-6: VPH-31; carril 7: marcador de peso molecular; carriles 8-10: VPH-33 y carriles 11-13: VPH-35. **B.** Carriles 1-5: Beta tubulina; carriles 6 y 12: marcador de peso molecular; carriles 7-11: VPH-58; carriles 13-17: VPH-39. **C.** Carriles 1-5: VPH-51; carril 6: marcador de peso molecular; carriles 7-11: VPH-52. **D.** Carriles 1-4: VPH-18, -45, -59 y -51; carril 5: marcador de peso molecular; carriles 6-8: VPH-56 (sin amplificación), VPH-68 y VPH-73 (amplificación inespecífica). **E.** Carriles 1-4: VPH-56; carril 5: marcador de peso molecular; carriles 6-10: VPH-73.

Tabla 6.

Confirmación de clonación del plásmido de E6/E7 de cada de VPH-AR por secuenciación Sanger.

| Consulta | Sujeto | | Puntuación | | Identidades | | | |
|-----------------------------|----------------------------|---|------------|-----|-------------|---------|---------------|-------|
| | Nombre | Acceso en GenBank | Gen | Bit | Crudo | Valor E | Coincidencias | Total |
| H200326-018_E02_VPH16C1_CAF | KY549319.1 | Human papillomavirus type 16 isolate C653860R21655560(40w), complete genome | 1038 | 562 | 0.0 | 579 | 586 | 99 |
| H200326-018_G02_VPH18C1_CAF | KC470209.1 | Human papillomavirus type 18 isolate Qv12247, complete genome | 1478 | 800 | 0.0 | 802 | 803 | 99 |
| H200326-018_I02_VPH31C2_CAF | KX514430.1 | Human papillomavirus type 31 isolate 295, complete genome | 1373 | 743 | 0.0 | 747 | 749 | 99 |
| H200326-018_K02_VPH33C2_CAF | JQ976767.1 | Human papillomavirus type 33 isolate S42091 E6 (E6) and E7 (E7) genes, complete cds | 1402 | 759 | 0.0 | 762 | 763 | 99 |
| H200326-018_M02_VPH35C1_CAF | KY565668.1 | Human papillomavirus type 35 isolate 127_RJ E6 and E7 genes, complete cds | 1384 | 749 | 0.0 | 751 | 752 | 99 |
| H200326-018_O02_VPH39C1_CAF | KX514417.1 | Human papillomavirus type 39 isolate 16B, complete genome | 1505 | 753 | 0.0 | 818 | 819 | 99 |

| | | | | | | | | |
|-----------------------------|----------------------------|--|------|-----|-----|-----|-----|----|
| H200326-018_A04_VPH45C5_T7 | KF591349.1 | Human papillomavirus type 45 pop-variant IARC variant 18 early protein E6 and early protein E7 genes, complete cds | 1483 | 803 | 0.0 | 805 | 806 | 99 |
| H200326-018_C04_VPH51C5_T7 | KX514432.1 | Human papillomavirus type 51 isolate 108B, complete genome | 1373 | 743 | 0.0 | 748 | 750 | 99 |
| H200326-018_E04_VPH52C1_CAF | KU298910.1 | Human papillomavirus type 52 isolate 65A.52, complete genome | 435 | 235 | 0.0 | 241 | 244 | 99 |
| H200326-018_G04_VPH56C2_CAF | EF177176.1 | Human papillomavirus type 56 clone Qv26762, complete genome | 1445 | 782 | 0.0 | 786 | 788 | 99 |
| H200326-018_I04_VPH58C7_CAF | LC376008.1 | Human papillomavirus type 58 CINJ3 DNA, complete genome | 1349 | 802 | 0.0 | 732 | 733 | 99 |
| H200326-018_K04_VPH59C1_CAF | KC470262.1 | Human papillomavirus type 59 isolate Qv00231, complete genome | 1487 | 805 | 0.0 | 809 | 811 | 99 |
| H200326-018_M04_VPH68C1_CAF | KC470267.1 | Human papillomavirus type 68 isolate Qv23347, complete genome | 1476 | 799 | 0.0 | 803 | 805 | 99 |
| H200326-018_O04_VPH73C3_CAF | KU298937.1 | Human papillomavirus type 73 isolate 118B.73, complete genome | 1362 | 737 | 0.0 | 741 | 743 | 99 |

Tras hacer los alineamientos de las secuencias con los respectivos genes E7 de referencia se encontraron mutaciones génicas por inserción y sustitución (sinónima y no sinónima) en 7 genotipos de VPH-AR (VPH-16, -45, -52, -56, -59, -68 y -73) (Tabla 7).

Tabla 7.*Mutaciones génicas encontradas en el ORF de E7 de algunos genotipos de VPH-AR*

| Genotipo | ORF E7 | | | | Aminoácido |
|-----------------|-----------------|-------------|-------------|-------|---------------------------|
| VPH-16 | 96_100ins AGAGG | | 102ins G | | E33ins / E34ins |
| VPH-45 | A12C | | G246T | | E6A / E82D |
| VPH-52 | T199C | | G249A | | Mutaciones sinónimas |
| VPH-56 | G34A | C149T | T182C | G231C | V12I / A50V / I61T / Q77H |
| VPH-59 | | A283G | | | T95A |
| VPH-68 | G53A | G64C | A155T | C191G | C18Y / E22Q / Q52L / T64R |
| | A202C-C203T | C222G | C223G-T224C | C248T | T68L / N74K / L75A / S83L |
| | G255C | A266C-G267A | G271C | T275A | E85D / K89T / E91Q / L92Q |
| VPH-73 | G240T | | A253G | | E80D / T85A |

4.2. Estandarización de cuatro qPCR multiplex del oncogén E7 para la detección de 14 genotipos de VPH-AR.

4.2.1. Diseño de cebadores y sondas Taqman

Los cebadores específicos para cada uno de los ORF E7 de 14 genotipos de VPH-AR fueron diseñados para amplificar productos con longitudes desde 121 hasta 228 pb, temperaturas de anillamiento de 56 a 60°C y contenidos de guanina y citosina de 34 a 55% (Tabla 8).

Igualmente, las sondas específicas de cada genotipo tuvieron temperaturas de anillamiento desde 62 a 68°C y contenidos de guanina y citosina de 42 a 68%. Los fluoróforos y apagadores escogidos según los espectros de excitación y emisión para cada multiplex fueron: FAM-BHQ1, CAL Fluor Gold 540-BHQ1, CAL Fluor Red-BHQ2 610, Quasar 670-BHQ2 y Quasar 705-BHQ2 (Tabla 8).

Se rediseñó el cebador directo de VPH-16 para acortar la longitud del fragmento amplificado (de 239 a 121 pb). Estos cebadores y sondas se diseñaron teniendo en cuenta secuencias de referencia. Después de obtener los resultados de la secuenciación fue necesario diseñar un nuevo cebador directo y la sonda de VPH-68 (Figura 7).

Tabla 8.

Cebadores y sondas Taqman diseñados dirigidos a la región E7 de VPH-AR y a Beta tubulina.

| Nombre | Acceso en GenBank | Cebador/sonda | Tm | GC% | Longitud | |
|---------------|-------------------|---------------|---------------------|-------|----------|-----|
| Beta tubulina | NG_034142.1 | Directo | 57.55 | 39.13 | | |
| | | Inverso | 57.65 | 47.62 | 121 | |
| VPH-16 | K02718 | Sonda | Quasar705- -BHQ2 | 64.58 | 68.18 | |
| | | Directo | | 57.06 | 45.00 | |
| | | Inverso | | 57.74 | 55.56 | 161 |
| VPH-18 | GQ180792.1 | Sonda | Fam- -BHQ1 | 64.36 | 61.54 | |
| | | Directo | | 59.28 | 50.00 | |
| | | Inverso | | 59.06 | 55.00 | 138 |
| VPH-31 | J04353 | Sonda | CALFluorGold- -BHQ1 | 64.02 | 55.56 | |
| | | Directo | | 57.89 | 50.00 | |

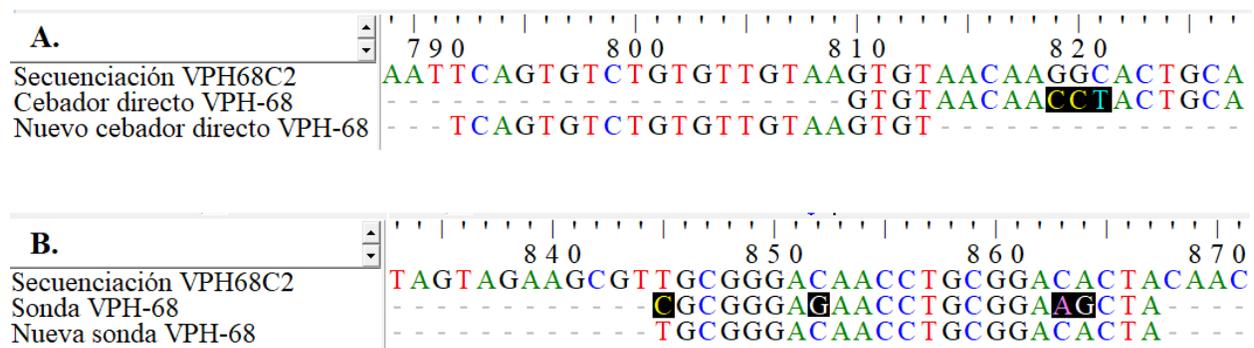
| | | | | | | |
|---------------|-------------|----------------|---------------------|-------|-------|-----|
| | | Inverso | | 58.53 | 50.00 | 228 |
| | | Sonda | CALFluorRed- -BHQ2 | 62.87 | 42.86 | |
| VPH-33 | M12732 | Directo | | 58.01 | 47.62 | |
| | | Inverso | | 58.17 | 47.62 | 219 |
| | | Sonda | Quasar670- -BHQ2 | 64.26 | 60.71 | |
| VPH-35 | M74117 | Directo | | 59.47 | 55.00 | |
| | | Inverso | | 58.58 | 47.62 | 153 |
| | | Sonda | FAM- -BHQ1 | 63.64 | 50.00 | |
| VPH-39 | M62849 | Directo | | 57.55 | 50.00 | |
| | | Inverso | | 57.53 | 50.00 | 155 |
| | | Sonda | CALFluorGold- -BHQ1 | 64.15 | 57.14 | |
| VPH-45 | X74479 | Directo | | 58.14 | 50.00 | |
| | | Inverso | | 57.88 | 50.00 | 172 |
| | | Sonda | CALFluorRed- -BHQ2 | 65.16 | 66.67 | |
| VPH-51 | NC_001533.1 | Directo | | 57.43 | 40.91 | |
| | | Inverso | | 60.04 | 50.00 | 223 |
| | | Sonda | Quasar670- -BHQ2 | 65.18 | 58.33 | |
| VPH-52 | LC373207.1 | Directo | | 57.08 | 55.00 | |
| | | Inverso | | 57.15 | 55.00 | 146 |
| | | Sonda | FAM- -BHQ1 | 65.22 | 60.71 | |
| VPH-56 | NC_001594.1 | Directo | | 59.40 | 47.62 | |
| | | Inverso | | 58.00 | 42.86 | 211 |
| | | Sonda | CALFluorGold- -BHQ1 | 64.52 | 44.83 | |
| VPH-58 | NC_001443.1 | Directo | | 58.11 | 50.00 | |
| | | Inverso | | 57.93 | 52.63 | 195 |
| | | Sonda | CALFluorRed- -BHQ2 | 64.12 | 62.50 | |

| | | | | | |
|---------------|------------|----------------|---------------------|-------|-------|
| VPH-59 | KC470266.1 | Directo | 58.14 | 50.00 | |
| | | Inverso | 57.65 | 50.00 | 184 |
| | | Sonda | Quasar670- -BHQ2 | 63.35 | 56.52 |
| VPH-68 | Y14591.1 | Directo | 57.53 | 40.91 | |
| | | Inverso | 57.99 | 52.63 | 138 |
| | | Sonda | FAM- -BHQ1 | 68.27 | 60.87 |
| VPH-73 | X94165 | Directo | 56.97 | 40.91 | |
| | | Inverso | 56.01 | 34.78 | 185 |
| | | Sonda | CALFluorGold- -BHQ1 | 63.70 | 48.15 |

Nota: No se muestran las secuencias de los cebadores y las sondas debido a que están siendo sometidas a proceso de protección intelectual.

Figura 7.

Inconcordancias en el cebador directo y la sonda dirigidos al oncogén E7 de VPH-68



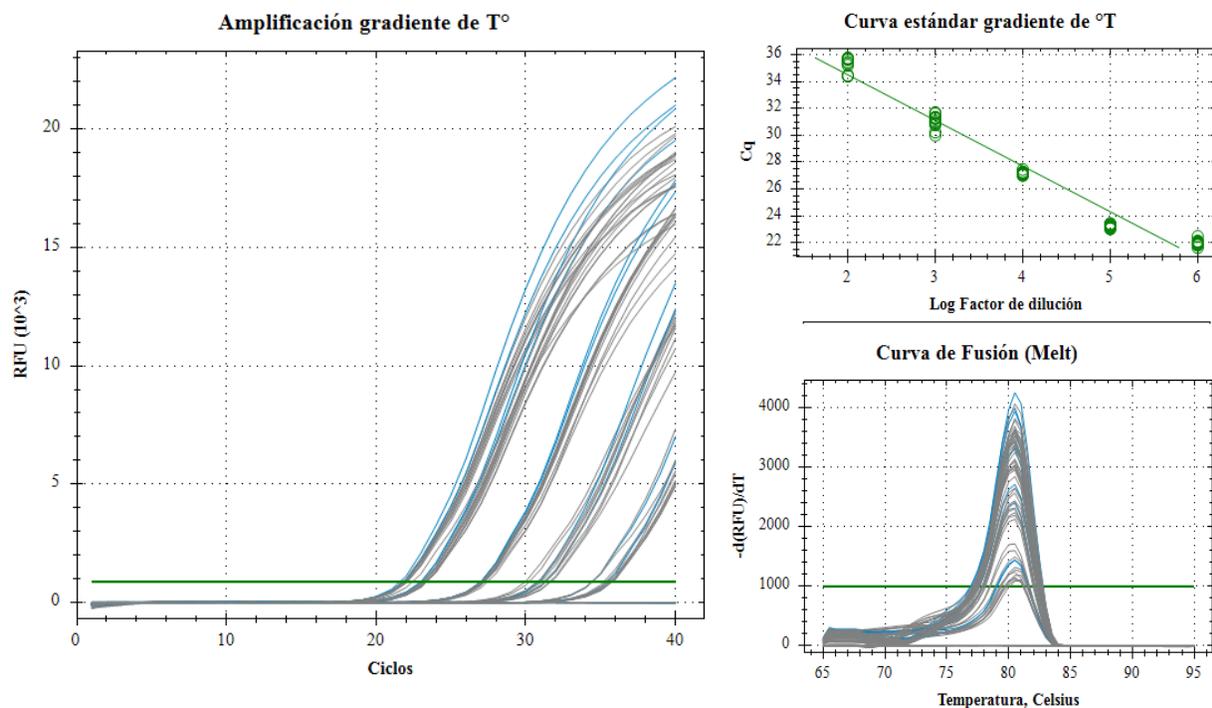
Nota: **A.** G819C, G820C y C821T en ORF E7 de VPH-68 afectando el cebador directo. **B.** T845C, C852G, C863A y A864G en ORF E7 de VPH-68 afectando la sonda de hidrólisis.

4.2.2. Optimización de las condiciones de la qPCR: Sistema EvaGreen.

Se optimizaron las condiciones de amplificación individualmente, se hicieron gradientes de temperatura de anillamiento desde 55°C hasta 60°C por 5 segundos, utilizando 5 diluciones seriadas de los plásmidos (10^6 - 10^2) y se escogió 57°C como la mejor temperatura de alineamiento (Figura 8).

Figura 8.

Amplificación de E7 de cada VPH-AR aplicando un gradiente de temperatura de 55°C a 60°C

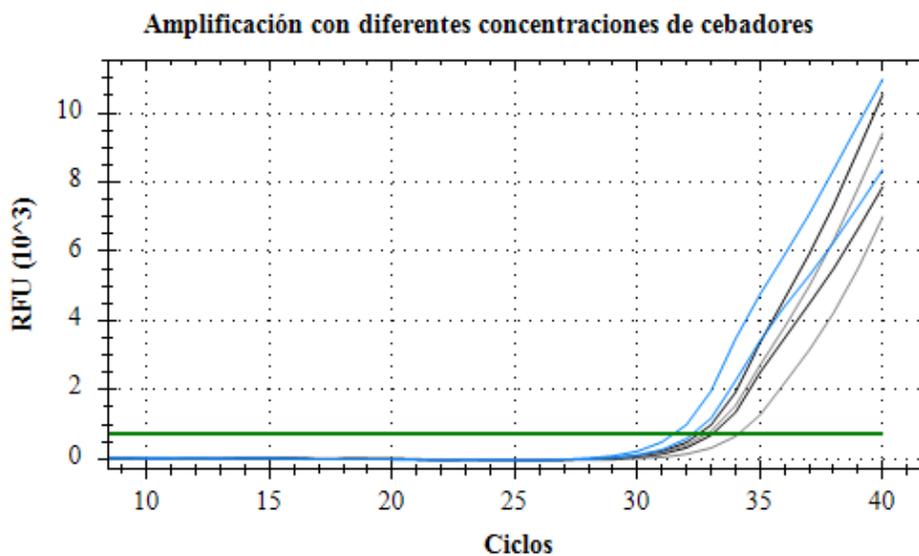


Nota: Se evaluaron 6 temperaturas de anillamiento con 5 diluciones seriadas de los plásmidos, los cuales amplificaron en los siguientes ciclos umbrales: 1) 55°C: 23,72 - 24,43 - 28,44 - 32,99 y 36,97; 2) 56°C: 23,15 - 24,44 - 28,42 - 32,50 y 36,93; 3) 57°C (curvas azules): 23,09 - 24,20 - 28,20 - 32,08 y 35,72; 4) 58,2°C: 23,27 - 24,64 - 28,49 - 32,16 y no amplificó; 5) 59,2°C: 23,30 - 24,59 - 28,34 - 32,29 y 36,58; y 6) 60°C: 23,36 - 24,69 - 28,73 - 32,89 y 37,04.

Se ajustó la concentración de los cebadores evaluando la concentración recomendada (500 nM), una concentración por debajo de la sugerida (300 nM) y una por encima (600 nM) utilizando la dilución 10^3 (Figura 9).

Figura 9.

Amplificación de la dilución 10^3 de VPH-AR con diferentes concentraciones de cebadores

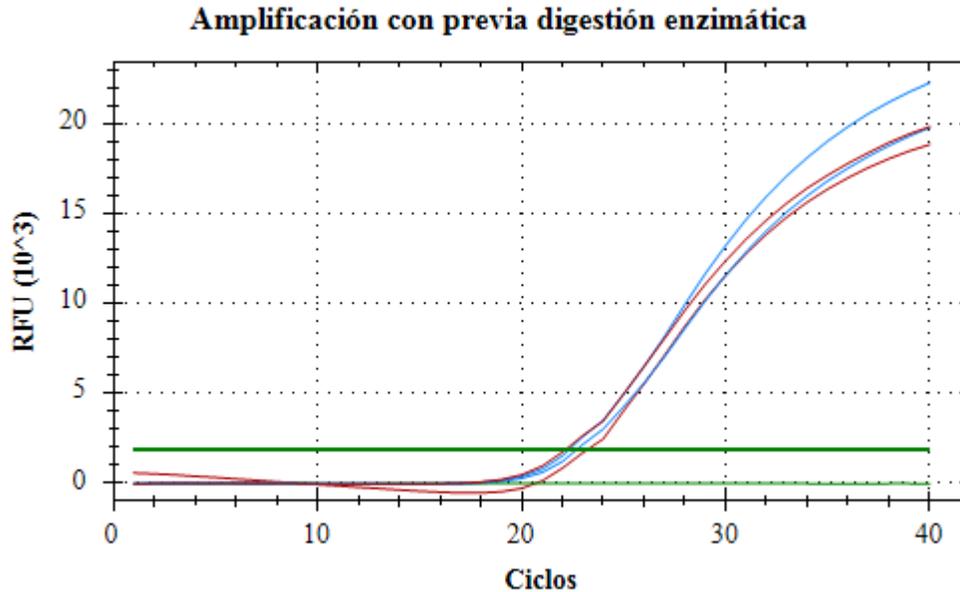


Nota: Se evaluaron 3 concentraciones de cebadores: 600 nM (curvas azules), 500 nM (curvas negras) y 300 nM (curvas grises).

Posteriormente, se amplificó una dilución concentrada de los plásmidos (10^6) añadiendo un paso previo de digestión enzimática (EcoRI durante 20 minutos a 37°C) sin encontrarse diferencias con respecto al control no digerido (Figura 10). Igualmente, se modificaron los tiempos de desnaturalización y de alineamiento de 5 a 10 segundos cada uno, sin encontrarse diferencias (datos no mostrados). La mezcla y el programa de amplificación final se describen en la tabla 9 y 10, respectivamente.

Figura 10.

Amplificación de la dilución 10^6 de VPH-AR con previa digestión enzimática



Nota: Los ciclos umbrales de amplificación del plásmido digerido (curvas rojas) estuvieron entre 23,21-22,13 y los del plásmido sin digerir entre 22,31 y 22,67.

Tabla 9.

Componentes de la qPCR de E7 estandarizada con EvaGreen

| Componente PCR | Concentración final | Volumen |
|------------------------------|----------------------------|----------------|
| SsoFast EvaGreen supermix 2x | 1x | 5 uL |
| Cebadores | 600 nM | 0,6 uL |
| Agua | - | 3,4 uL |
| ADN | 10^6 - 10^1 | 1 uL |
| Volumen final | - | 10 uL |

Tabla 10.*Programa de amplificación de la qPCR de E7 estandarizada con EvaGreen*

| Programa qPCR E7 EvaGreen | | | |
|----------------------------------|---------------------------|---------|----------------|
| 1 ciclo | Desnaturalización inicial | 95°C | 30 segundos |
| 40 ciclos | Desnaturalización | 95°C | 5 segundos |
| | Alineamiento | 57°C | 5 segundos |
| 1 ciclo | Curva de Melt | 65-95°C | 0,5°C cada 5 s |

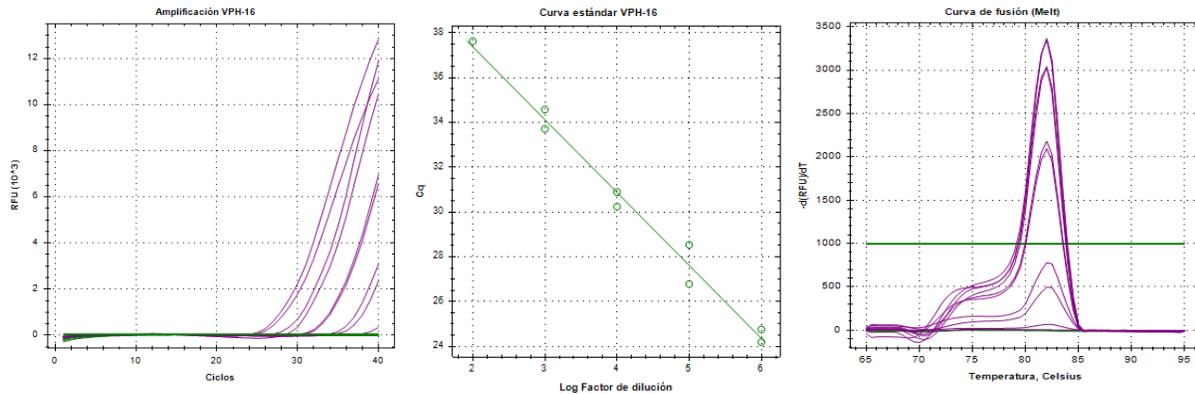
4.2.3. Construcción de curvas estándar.

Las curvas de amplificación para cuantificación absoluta de cada genotipo de VPH-AR fueron sigmoidales con límites de detección (LOD, del inglés *limits of detection*) desde 10 copias para los genotipos VPH-16, -33, -35, -45, -58, -68 y desde 10² copias para VPH-18, -31, -39, -51, -56, -59, -73; las Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU, del inglés *relative fluorescence units*) oscilaron desde 100 hasta 23.000 RFU; las eficiencias de amplificación estuvieron entre el 90 y 110%; las pendientes de la curva alrededor de -3,5 a -3,1; los coeficientes de correlación R² fueron $\geq 0,98$; y las curvas de Melt revelaron productos específicos con picos de fusión entre 78,5-83,0°C (Figuras 11-24).

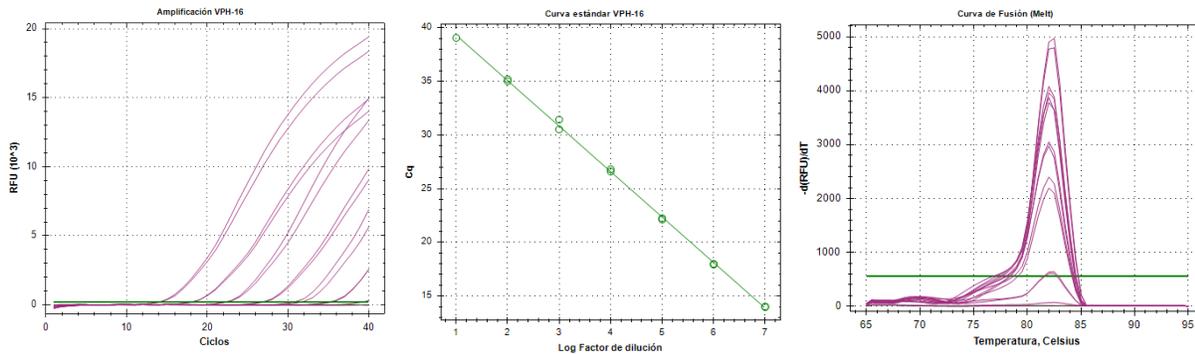
Figura 11.

Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-16

A. Fragmento amplificado de 239 pb



B. Fragmento amplificado de 161 pb

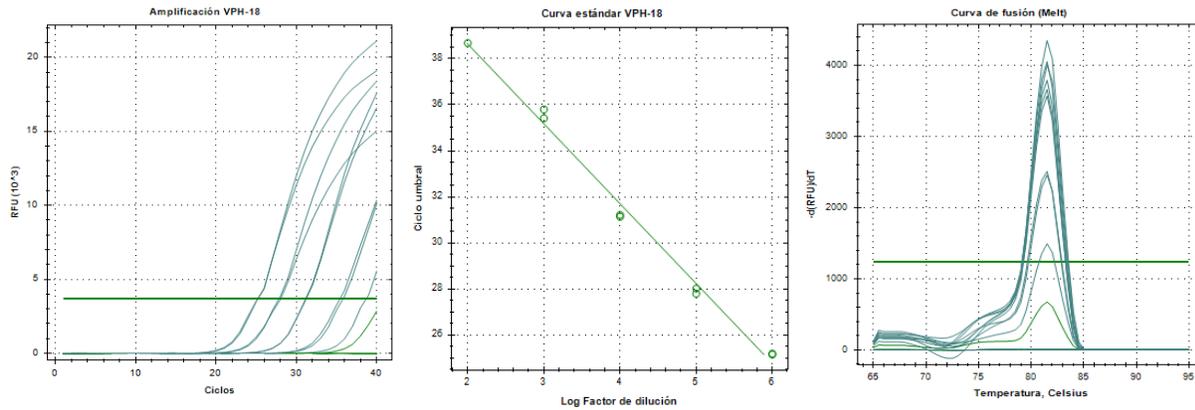


Nota: A. **Eficiencia:**71,9%, **R²:** 0,985, **Pendiente:**-4,250, **y-intersección:** 43,890, **T°Melt:**82,5C

B. **Eficiencia:**102,9%, **R²:** 0,999, **Pendiente:** -3,254, **y-intersección:** 47,160, **T°Melt:** 82 C

Figura 12.

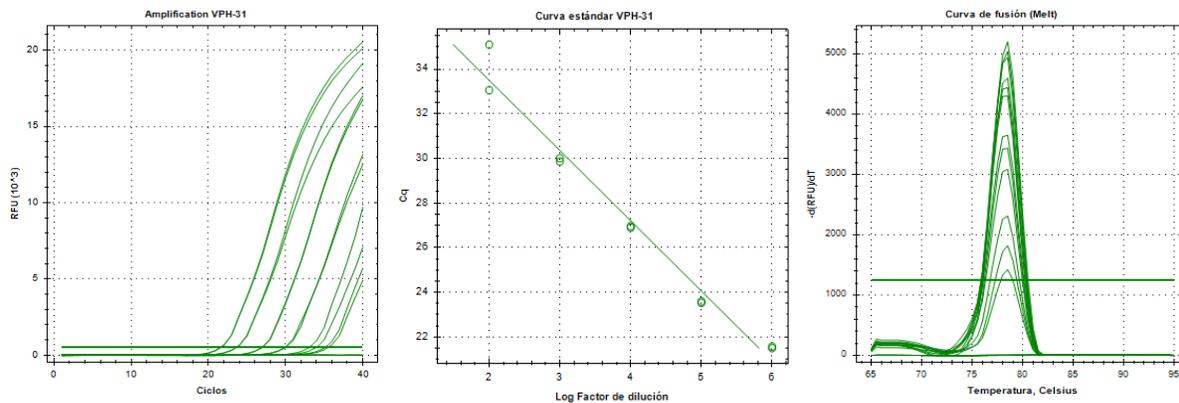
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-18



Nota: Eficiencia: 94,4%, R²: 0,992, Pendiente: -3,463, y-intersección: 45,559, T°Melt: 81,5 C

Figura 13.

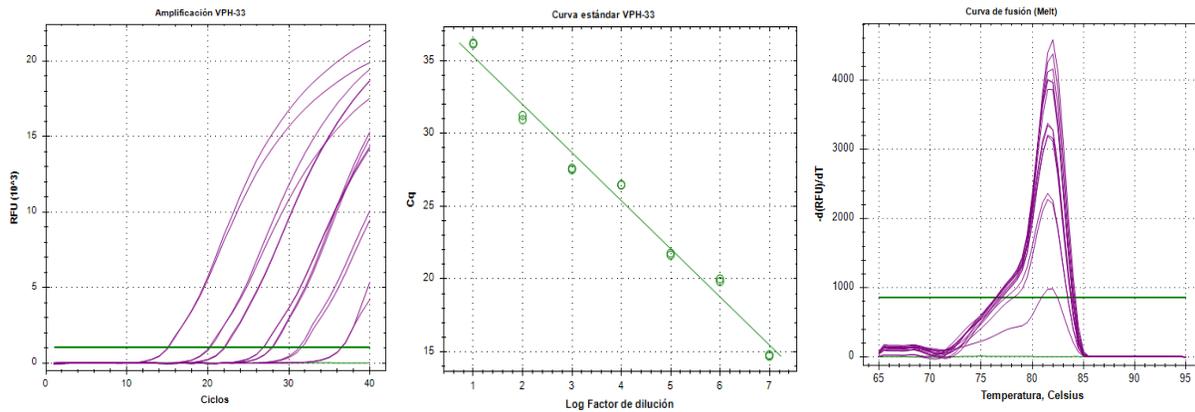
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-31



Nota: Eficiencia: 108%, R²: 0,978, Pendiente: -3,145, y-intersección: 39,788, T°Melt: 78,5C

Figura 14.

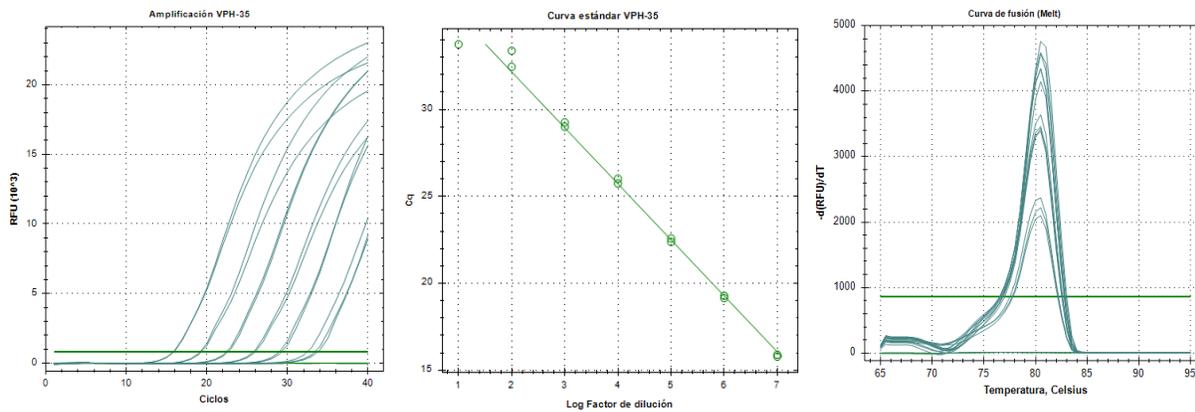
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-33



Nota: Eficiencia: 100,9%, R²: 0,981, Pendiente: -3,301, y-intersección: 39,586, T°Melt: 81,5C

Figura 15.

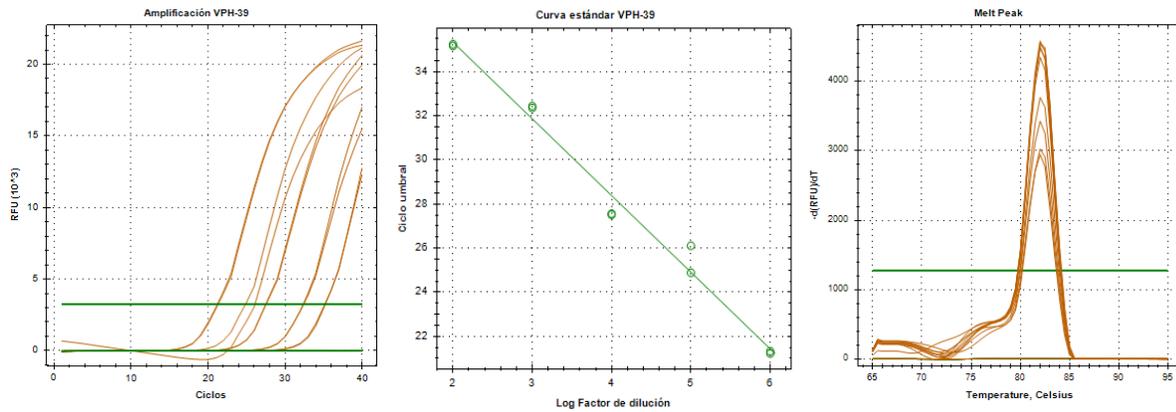
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-35



Nota: Eficiencia: 104,3%, R²: 0,991, Pendiente: -3,223, y-intersección: 38,615, T°Melt: 80,5C

Figura 16.

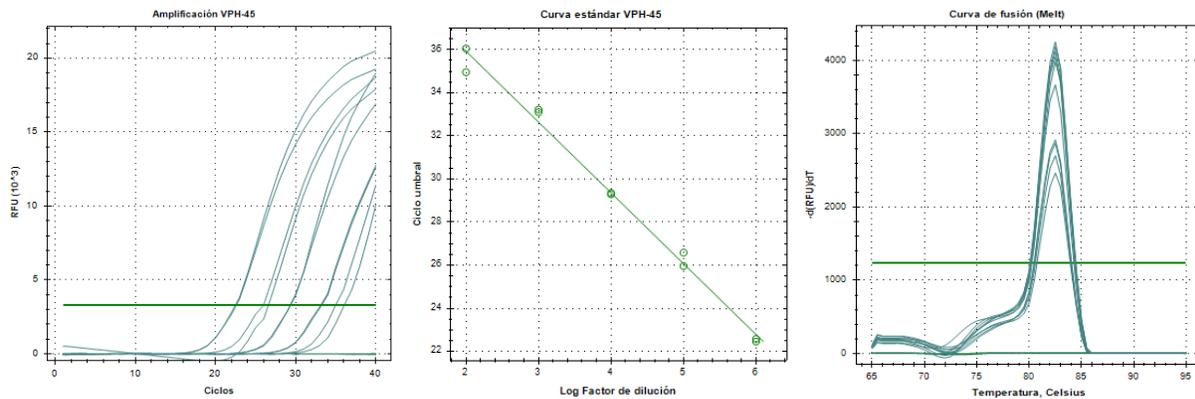
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-39



Nota: Eficiencia: 93,8%, R²: 0,986, Pendiente: -3,480, y-intersección: 42,304, T°Melt: 82 C

Figura 17.

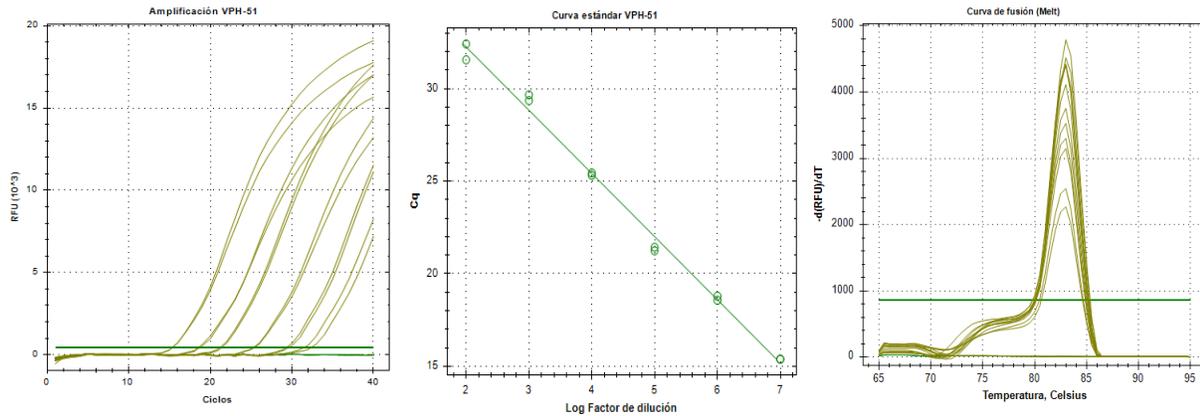
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-45



Nota: Eficiencia: 101,6%, R²: 0,991, Pendiente: -3,285, y-intersección: 42,497, T°Melt: 82,5C

Figura 18.

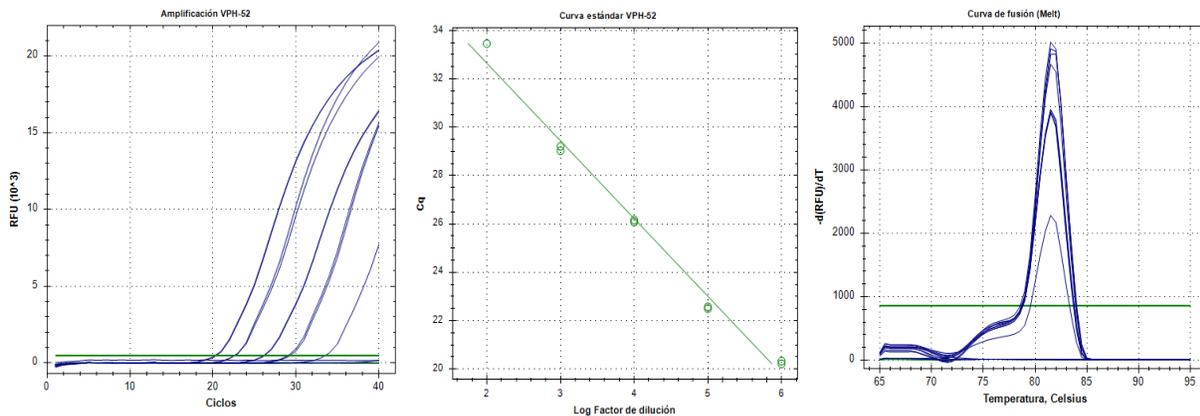
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-51



Nota: Eficiencia: 96,3% , R²: 0,994, Pendiente: -3,414, y-intersección: 39,079, T°Melt: 83 C

Figura 19.

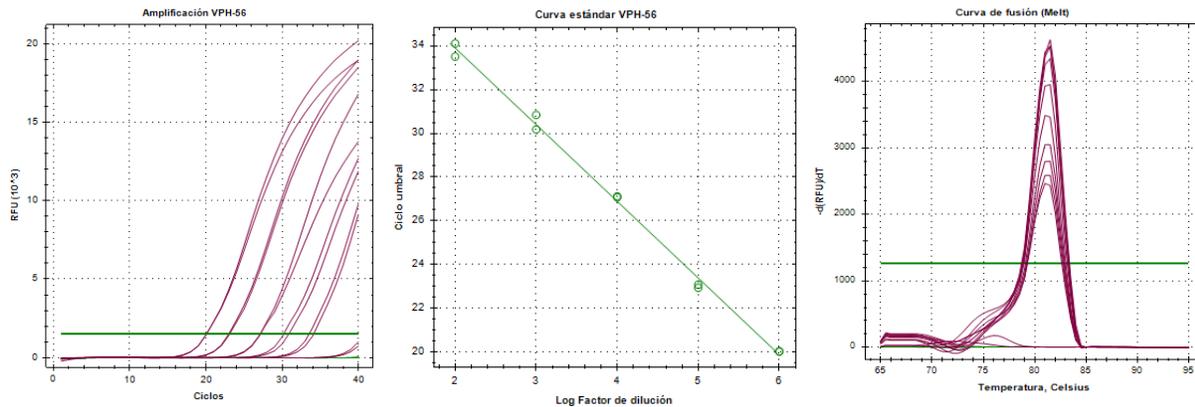
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-52



Nota: Eficiencia: 104,6%, R²: 0,989, Pendiente: -3,215, y-intersección: 39,083, T°Melt: 81,5C

Figura 20.

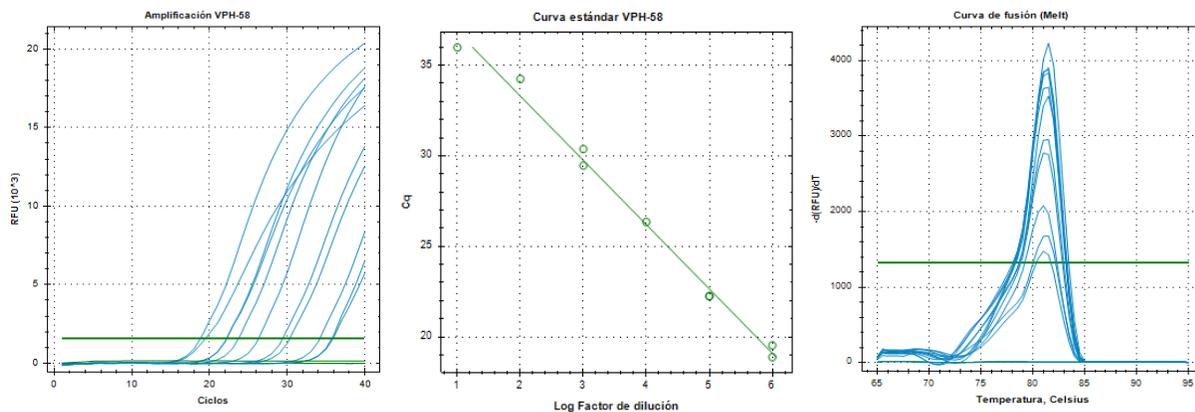
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-56



Nota: Eficiencia: 93,0%, R²: 0,996, Pendiente: -3,501, y-intersección: 40,899, T°Melt: 81,5C

Figura 21.

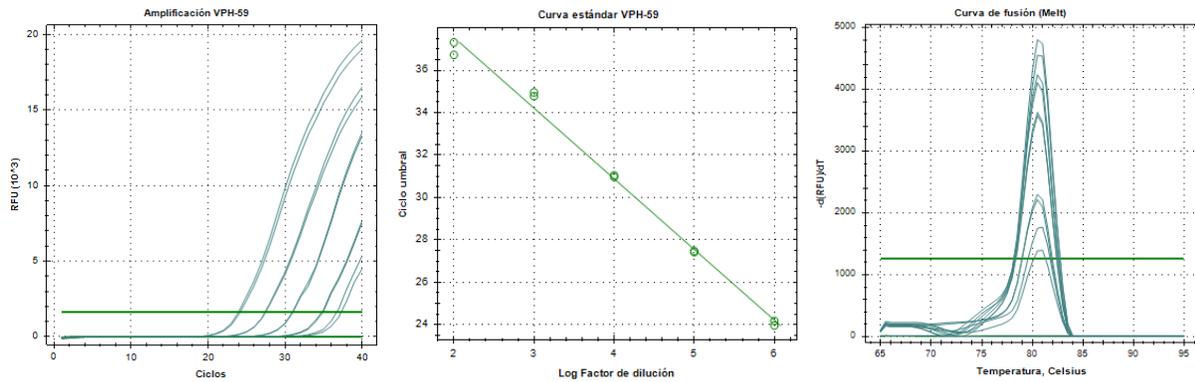
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-58



Nota: Eficiencia: 91,3%, R²: 0,991, Pendiente: -3,550, y-intersección: 40,402, T°Melt: 81,5 C

Figura 22.

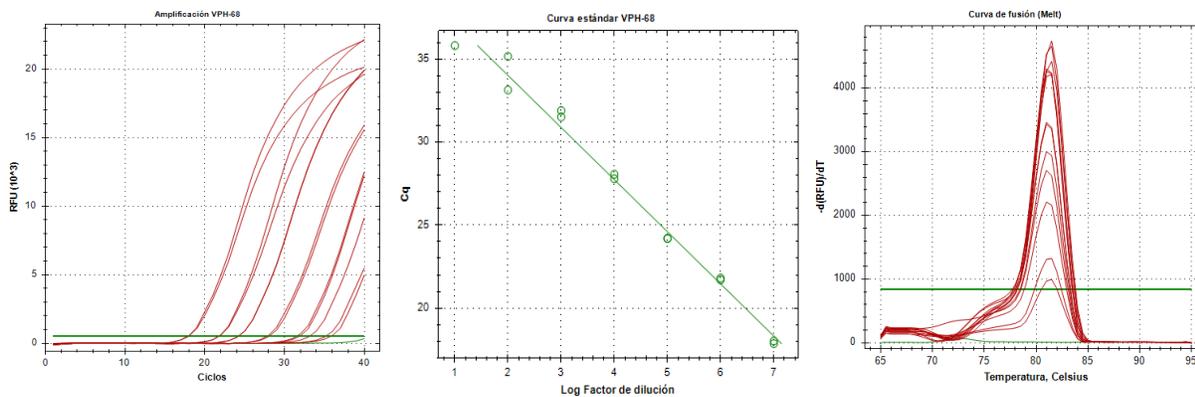
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-59



Nota: Eficiencia: 99,6%, R^2 : 0,992, Pendiente: -3,332, y-intersección: 44,213, T° Melt: 80,5C

Figura 23.

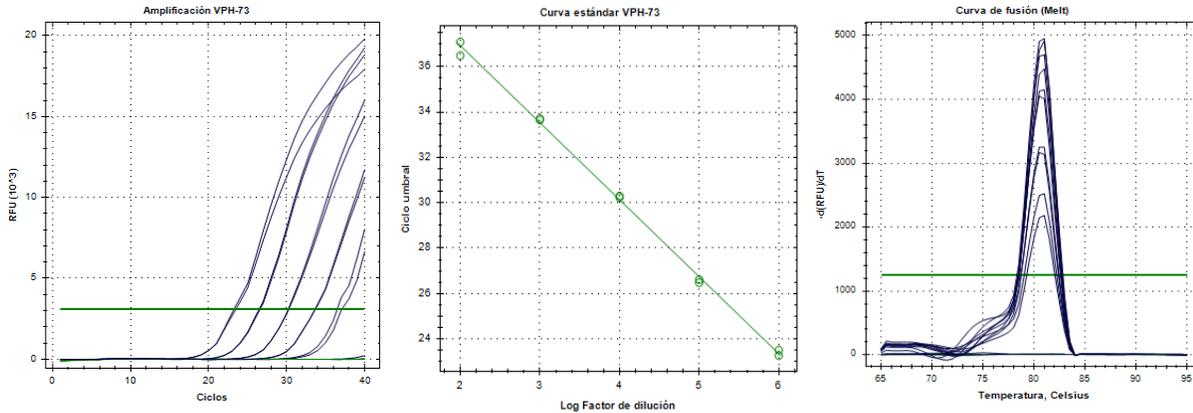
Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-68



Nota: Eficiencia: 108,1%, R^2 : 0,986, Pendiente: -3,142, y-intersección: 40,310, T° Melt: 81,5C

Figura 24.

Curvas de amplificación, de linealización y de temperatura de fusión de VPH-73



Nota: Eficiencia: 97% , R²: 0,998, Pendiente: -3,395 , y-intersección: 43,716, T°Melt: 81 C

4.2.4. Optimización de las condiciones de la qPCR con sondas de hidrólisis

Para la estandarización de la PCR en tiempo real con sondas de hidrólisis se trazaron las curvas para cuantificación absoluta para cada genotipo multiplexado de VPH-AR por triplicado de la misma manera como se hizo para el sistema EvaGreen. Se obtuvieron curvas de amplificación sigmoidales con LOD desde 10² copias para todos los genotipos excepto para VPH-51 y -59 para los cuales hubo amplificación desde 10³ copias; las RFU oscilaron desde 200 hasta 14.000 RFU; las eficiencias de amplificación estuvieron entre el 90 y 113%; las pendientes de la curva entre -3,5 y -3,0; los coeficientes de correlación R² se encontraron entre 0,965 y 1,0 (Figura 25-28). La mezcla y el programa de amplificación final de la qPCR multiplex se describen en la tabla 11 y 12, respectivamente.

Las curvas de amplificación y estándar de cada múltiplex se muestran de manera individual en los apéndices A-N. El quinto objetivo de cada multiplex fue un fragmento del gen de Beta

tubulina humana que será empleado como control de extracción de ADN y de ausencia de inhibidores de la PCR cuando se utilicen muestras de pacientes (Figura 29).

Tabla 11.

Componentes de la qPCR multiplex de E7 de VPH-AR

| Componente PCR | Concentración inicial | Concentración final | Volumen M1, M2, M3 | Volumen M4 |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|
| IQ Multiplex Powermix | 2x | 1x | 12,5 µL | 12,5 µL |
| Cebadores | 15 uM | 300 nM | 1,0 uL/objetivo = 5 µL | 1,0 uL/objetivo = 3 µL |
| Sondas | 10 uM | 200 nM | 0,5 uL/objetivo = 2,5µL | 0,5 uL/objetivo = 1,5µL |
| Agua | - | - | - | 5 µL |
| ADN | - | 10 ⁷ -10 ¹ | 1 uL/objetivo = 5 µL | 1 uL/objetivo = 3 µL |
| Volumen final | - | - | 25 µL | 25 µL |

Nota: En las primeras tres multiplex se detectan 5 objetivos mientras que en la cuarta se detectan 3 objetivos, en esta se completa con agua hasta el volumen final.

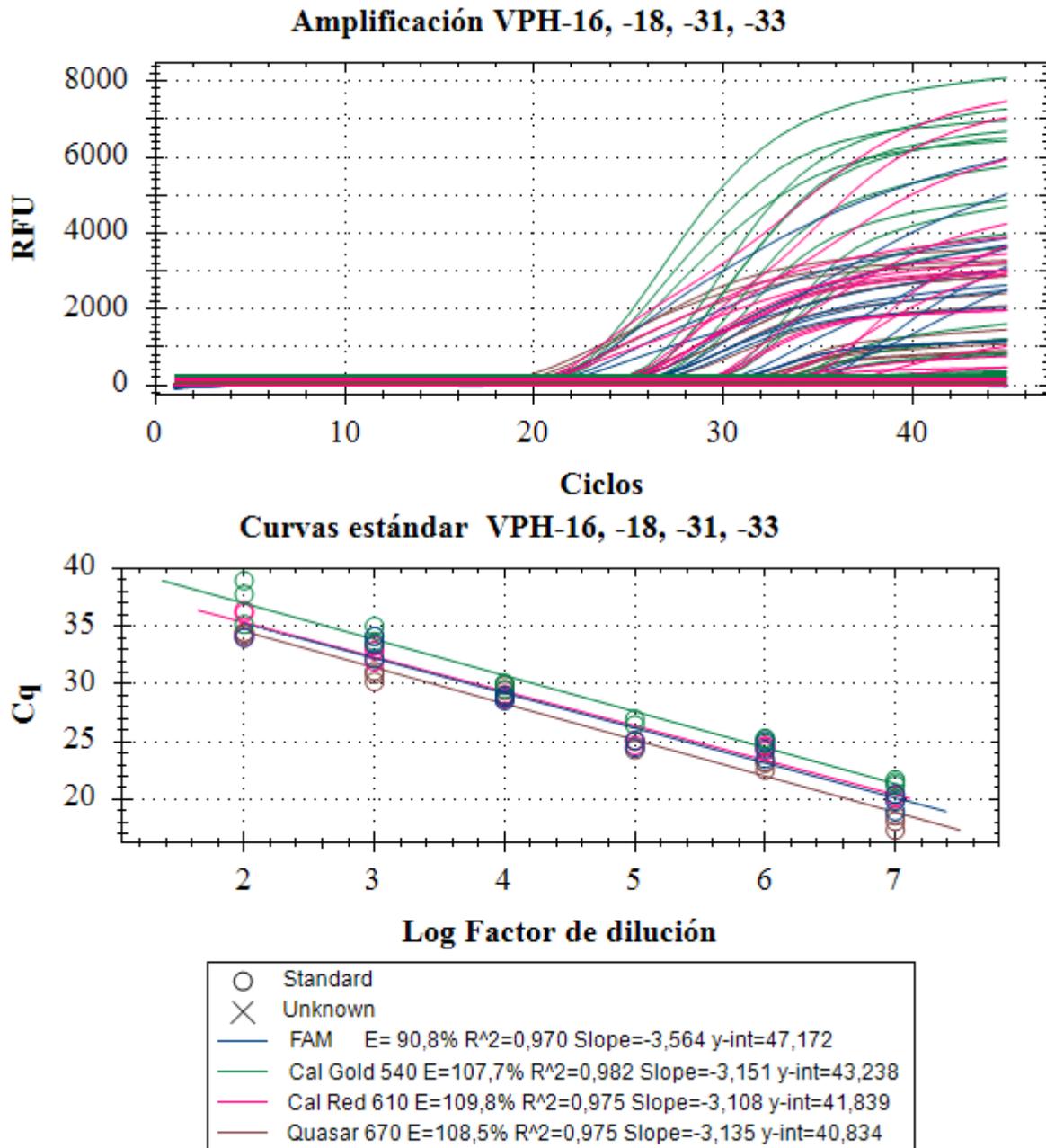
Tabla 12.

Programa de amplificación de la qPCR multiplex de E7 de VPH-AR

| Programa qPCR E7 | | | |
|------------------|---------------------------|------|-------------|
| 1 ciclo | Desnaturalización inicial | 95°C | 2 minutos |
| 45 ciclos | Desnaturalización | 95°C | 10 segundos |
| | Alineamiento | 57°C | 1 minuto |

Figura 25.

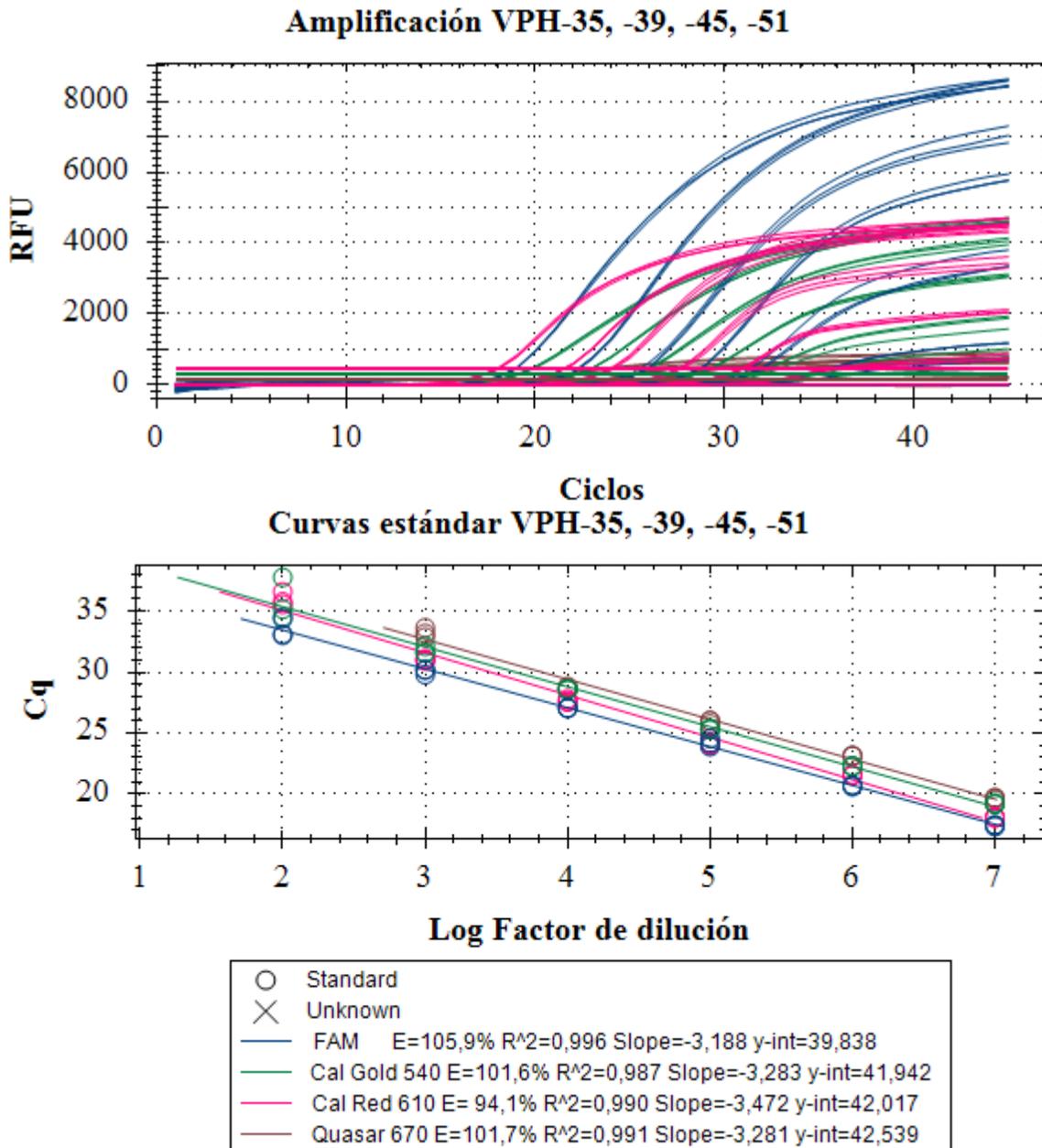
Curvas de amplificación y estándar de los genotipos de VPH-AR de la primera qPCR multiplex



Nota: Curvas de amplificación y curvas estándar de qPCR multiplex basadas en sondas de hidrólisis marcadas con los fluoróforos FAM, Cal Gold, Cal Red y Quasar 670 para la detección en las condiciones óptimas de amplificación de VPH-16, -18, -31 y -33, respectivamente. El coeficiente de correlación y la eficacia de amplificación para detectar los genotipos fueron: VPH-16 ($R^2 = 0,970$; $E = 90,8\%$), VPH-18 ($R^2 = 0,982$; $E = 107,7\%$), VPH-31 ($R^2 = 0,975$; $E = 109,8\%$) y VPH-33 ($R^2 = 0,975$; $E = 108,5\%$).

Figura 26.

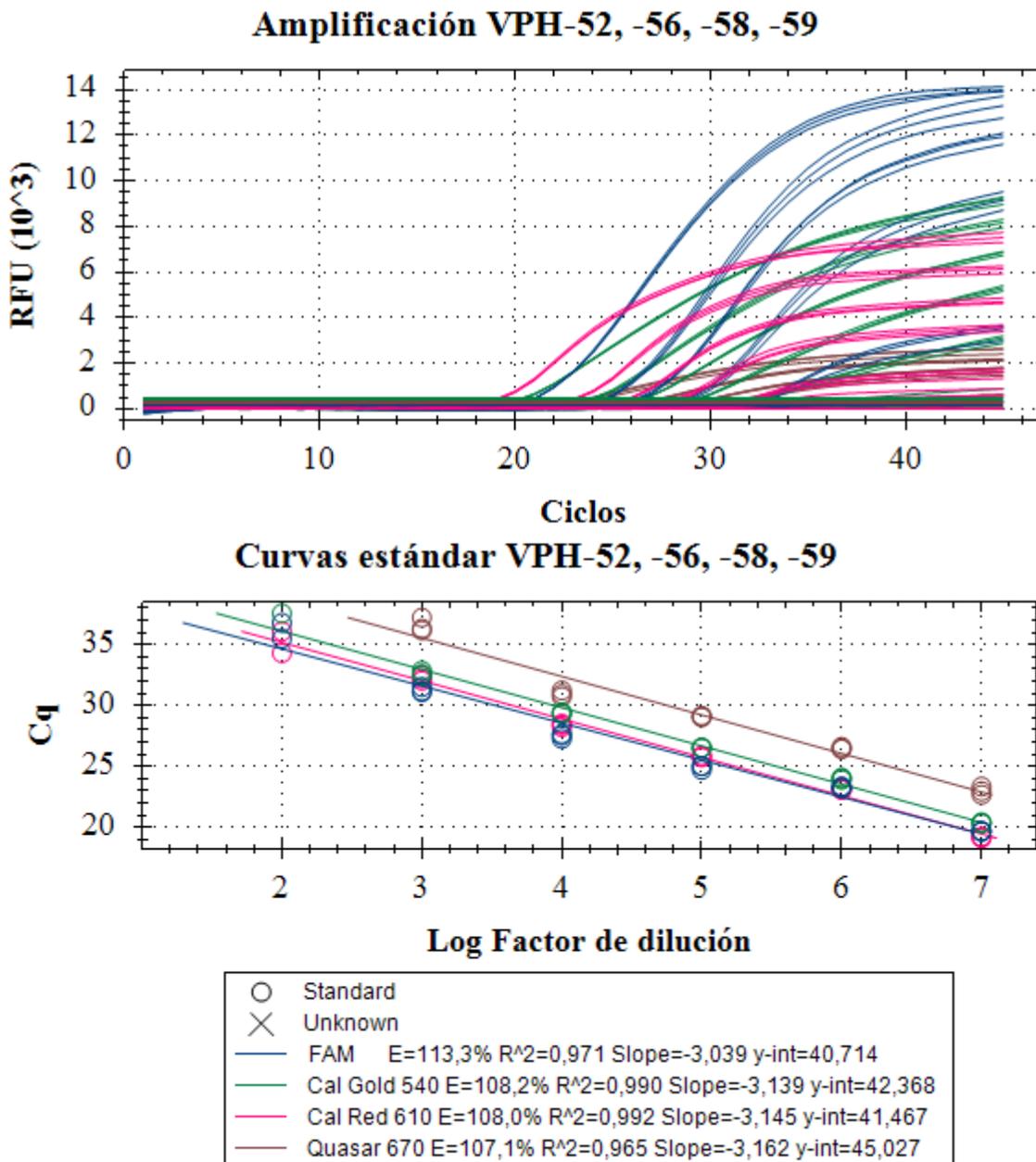
Curvas de amplificación y estándar de los genotipos de VPH-AR de la segunda qPCR multiplex



Nota: Curvas de amplificación y curvas estándar de qPCR multiplex basadas en sondas de hidrólisis marcadas con los fluoróforos FAM, Cal Gold, Cal Red y Quasar 670 para la detección en las condiciones óptimas de amplificación de VPH-35, -39, -45 y -51, respectivamente. El coeficiente de correlación y la eficacia de amplificación para detectar los genotipos fueron: VPH-35 ($R^2 = 0,996$; $E = 105,9\%$), VPH-39 ($R^2 = 0,987$; $E = 101,6\%$), VPH-45 ($R^2 = 0,990$; $E = 94,1\%$) y VPH-51 ($R^2 = 0,991$; $E = 101,7\%$).

Figura 27.

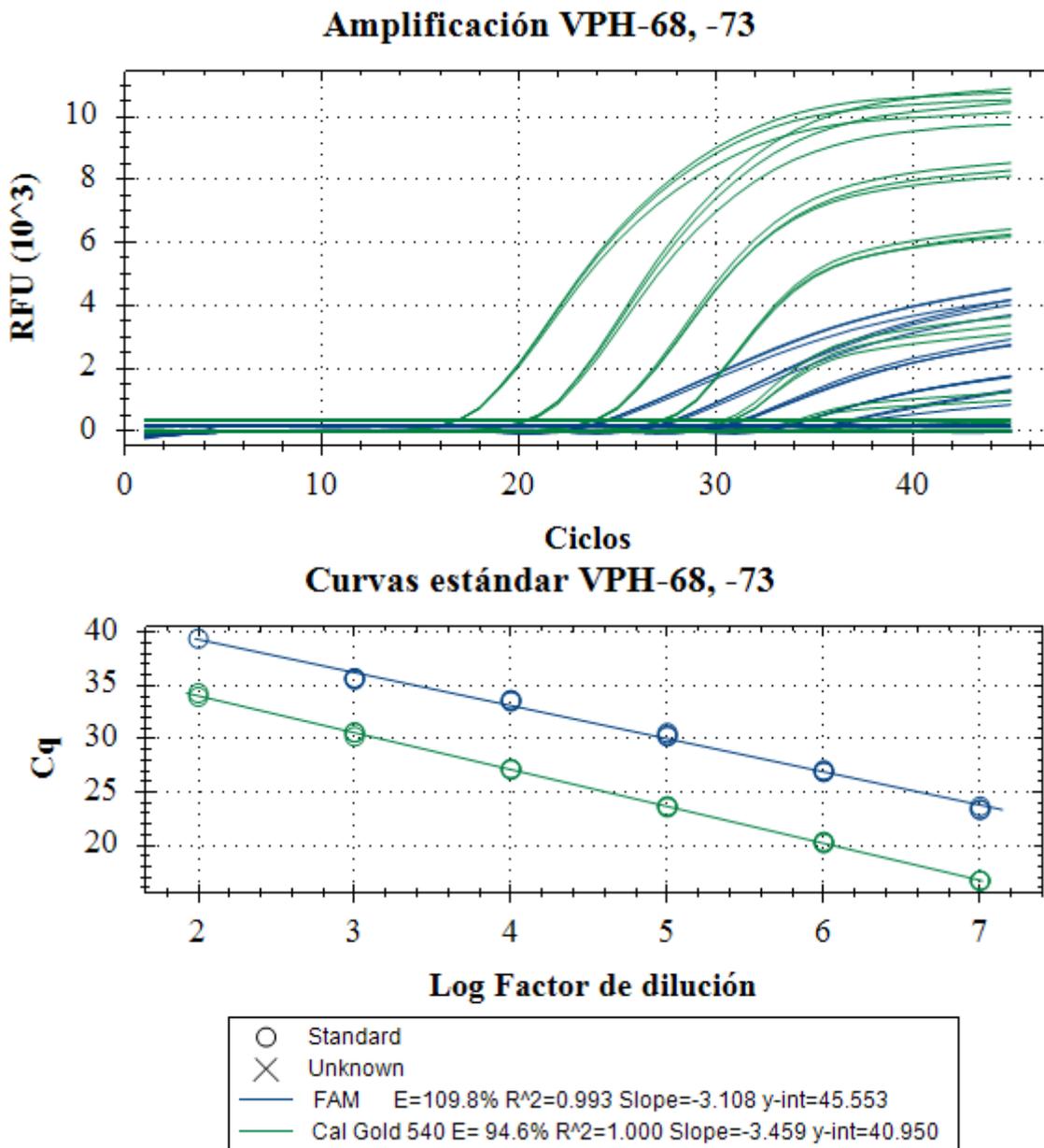
Curvas de amplificación y estándar de los genotipos de VPH-AR de la tercera qPCR multiplex



Nota: Curvas de amplificación y curvas estándar de qPCR multiplex basadas en sondas de hidrólisis marcadas con los fluoróforos FAM, Cal Gold, Cal Red y Quasar 670 para la detección en las condiciones óptimas de amplificación de VPH-52, -56, -58 y -59, respectivamente. El coeficiente de correlación y la eficacia de amplificación para detectar los genotipos fueron: VPH-52 ($R^2 = 0,971$; $E = 113,3\%$), VPH-56 ($R^2 = 0,990$; $E = 108,2\%$), VPH-58 ($R^2 = 0,992$; $E = 108,0\%$) y VPH-59 ($R^2 = 0,965$; $E = 107,1\%$).

Figura 28.

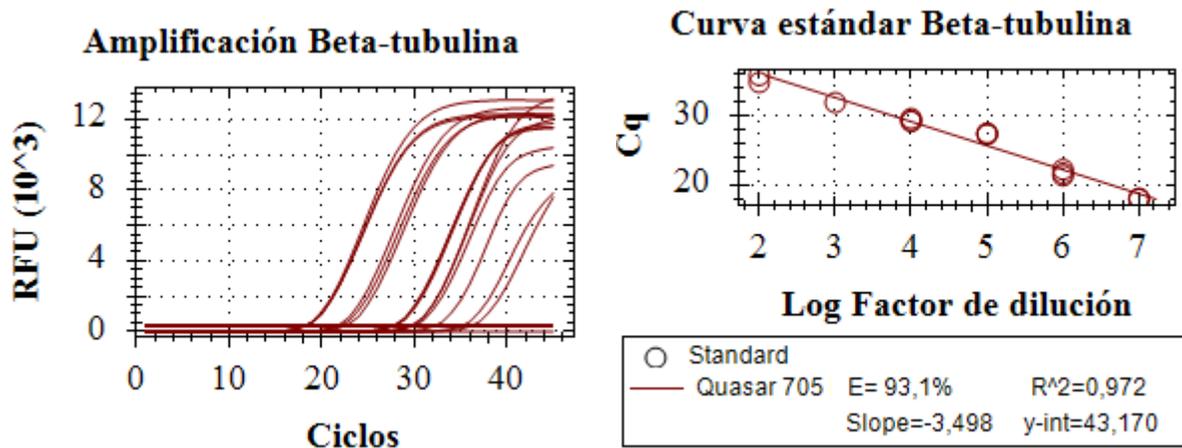
Curvas de amplificación y estándar de los genotipos de VPH-AR de la cuarta qPCR multiplex



Nota: Curvas de amplificación y curvas estándar de qPCR multiplex basadas en sondas de hidrólisis marcadas con los fluoróforos FAM y Cal Gold para la detección en las condiciones óptimas de amplificación de VPH-68 y -73, respectivamente. El coeficiente de correlación y la eficacia de amplificación para detectar los genotipos fueron: VPH-68 ($R^2 = 0,993$; $E = 109,8\%$) y VPH-73 ($R^2 = 1,0$; $E = 94,6\%$).

Figura 29.

Curvas de amplificación y estándar de qPCR de Beta tubulina



Nota: Curvas de amplificación y curvas estándar de qPCR multiplex basadas en sondas de hidrólisis marcadas con el fluoróforo Quasar 705 para la detección en las condiciones óptimas de amplificación de Beta tubulina. El coeficiente de correlación y la eficacia de amplificación fueron: R² = 0,972; E = 93,1%.

4.2.5. Verificación de concentraciones de E7 en los estándares utilizados en la qPCR multiplex de E7 utilizando PCR digital en gotas (ddPCR).

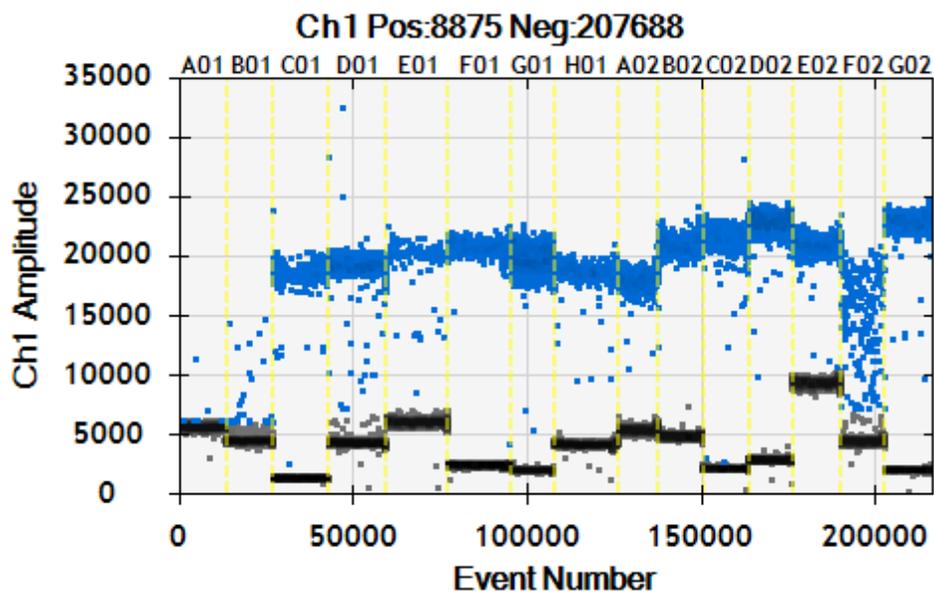
Al amplificar los 14 genotipos de VPH-AR se obtuvieron amplitudes de fluorescencia que permitieron separar claramente las gotas negativas de las positivas para todos los genotipos, excepto para VPH-68 en donde se observó un efecto de lluvia (Figura 30). A pesar de esto se pudo obtener una cuantificación absoluta para todos los genotipos de VPH-AR y el número de gotas en la reacción fue mayor a 10.000 en todos los casos.

En la reacción final se colocaron 5 µL de la dilución 10³ de cada genotipo (5000 copias), al dividir esto en el volumen final (24 µL) da un total de 208 copias de cada genotipo/µL. Este fue el

número esperado de copias para cada genotipo, sin embargo, se obtuvieron concentraciones desde 2,5 hasta 156 copias/ μ L con un promedio de 56 copias/ μ L (Figura 31).

Figura 30.

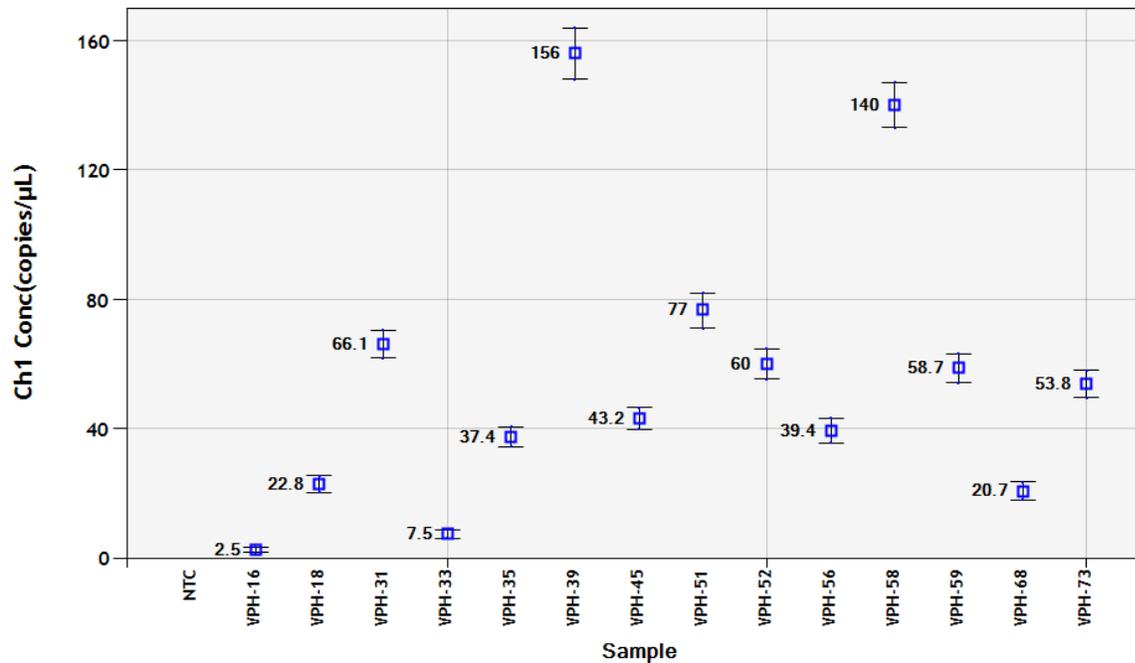
Amplitud de fluorescencia y número de gotas generadas en la ddPCR de E7 de cada VPH-AR



Nota: A01: Control sin ADN plantilla (NTC), B01: VPH-16, C01: VPH-18, D01: VPH-31, E01: VPH-33, F01: VPH-35, G01: VPH-39, H01: VPH-45, A02: VPH-51, B02: VPH-52, C02: VPH-56, D02: VPH-58, E02: VPH-59, F02: VPH-68 y G02: VPH-73.

Figura 31.

Concentración de cada genotipo de VPH-AR en copias/microlitro



4.2.6. Normalización de las concentraciones de copias de E7 de los estándares por ddPCR

Al realizar la normalización de la concentración 10^3 copias, se realizaron nuevamente las curvas estándar de las cuatro multiplex. El LOD fue 10^0 copias para todos los genotipos excepto para VPH-58 para el cual hubo amplificación desde 10^1 copias; las RFU oscilaron desde 400 hasta 14.000 RFU; las eficiencias de amplificación estuvieron entre el 82 y 111%; las pendientes de la curva entre -3,8 y -3,0; y los coeficientes de correlación R^2 entre 0,97 y 0,98 (Figura 32-35).

Las curvas de amplificación y estándar de cada múltiplex normalizada se muestran de manera individual en los apéndices A-N.

Figura 32.

Curvas de amplificación y estándar de la primera qPCR multiplex de E7 de VPH-AR post normalización por ddPCR

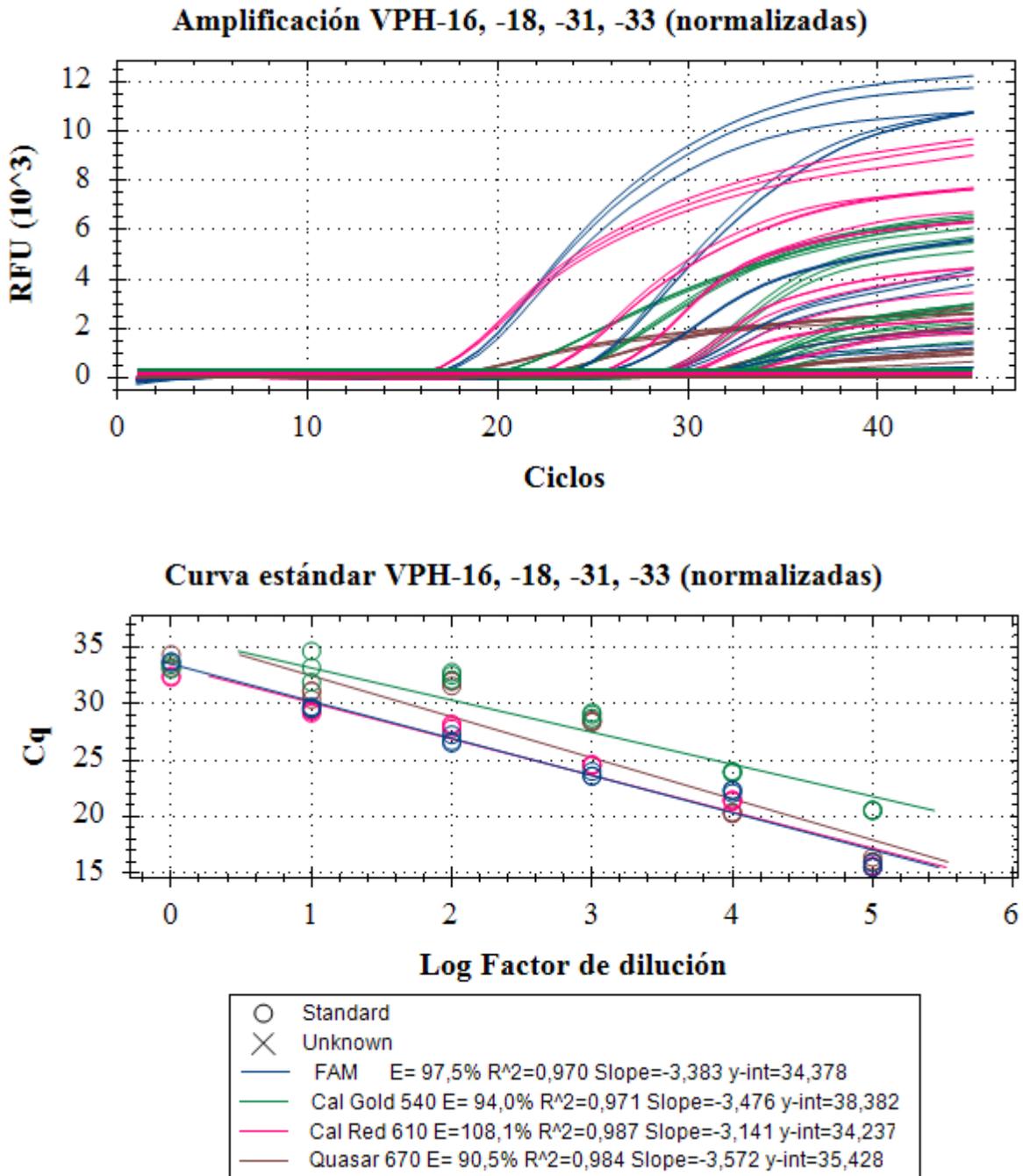


Figura 33.

Curvas de amplificación y estándar de la segunda qPCR multiplex de E7 de VPH-AR post normalización por ddPCR

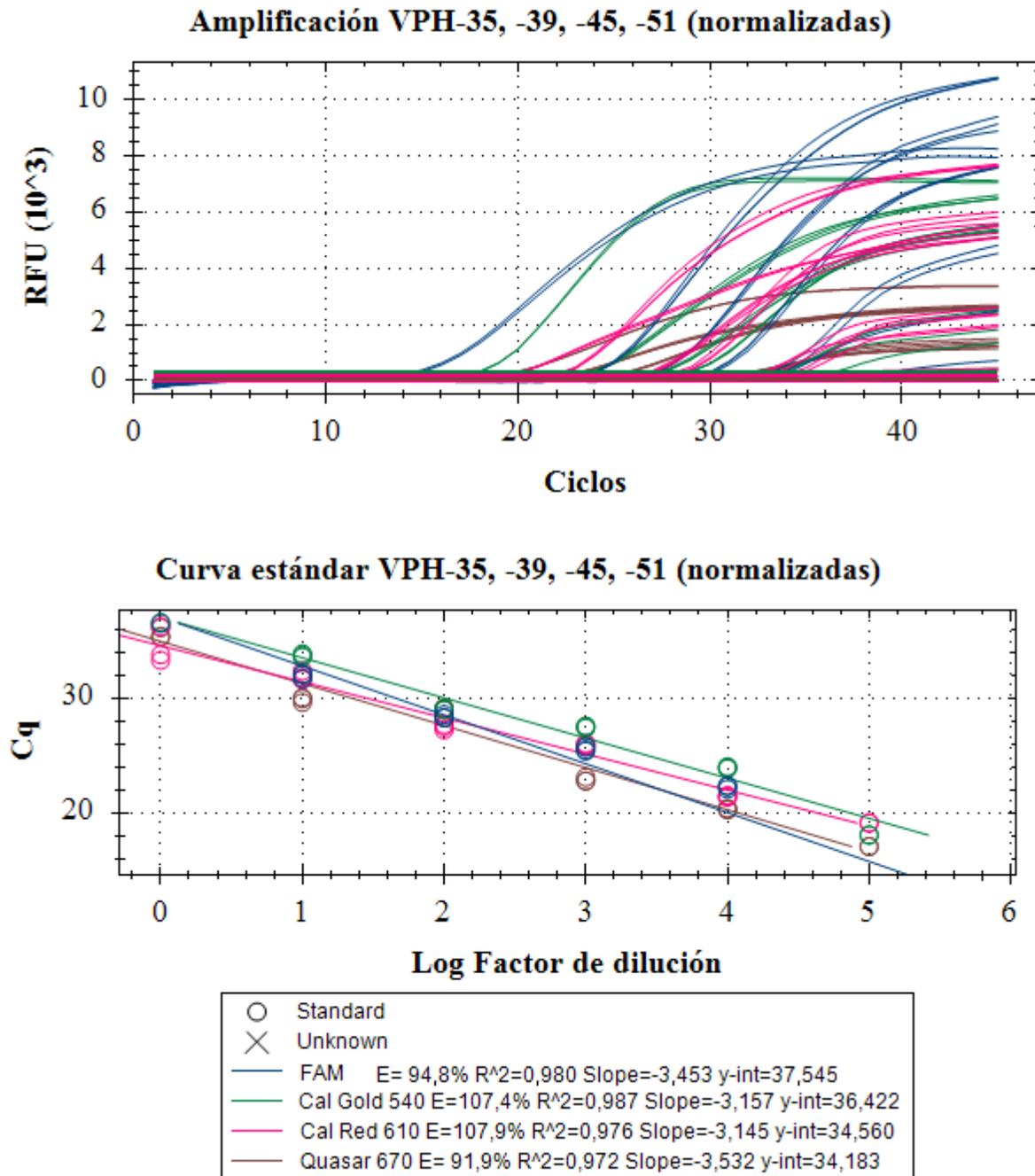


Figura 34.

Curvas de amplificación y estándar de la tercera qPCR multiplex de E7 de VPH-AR post normalización por ddPCR

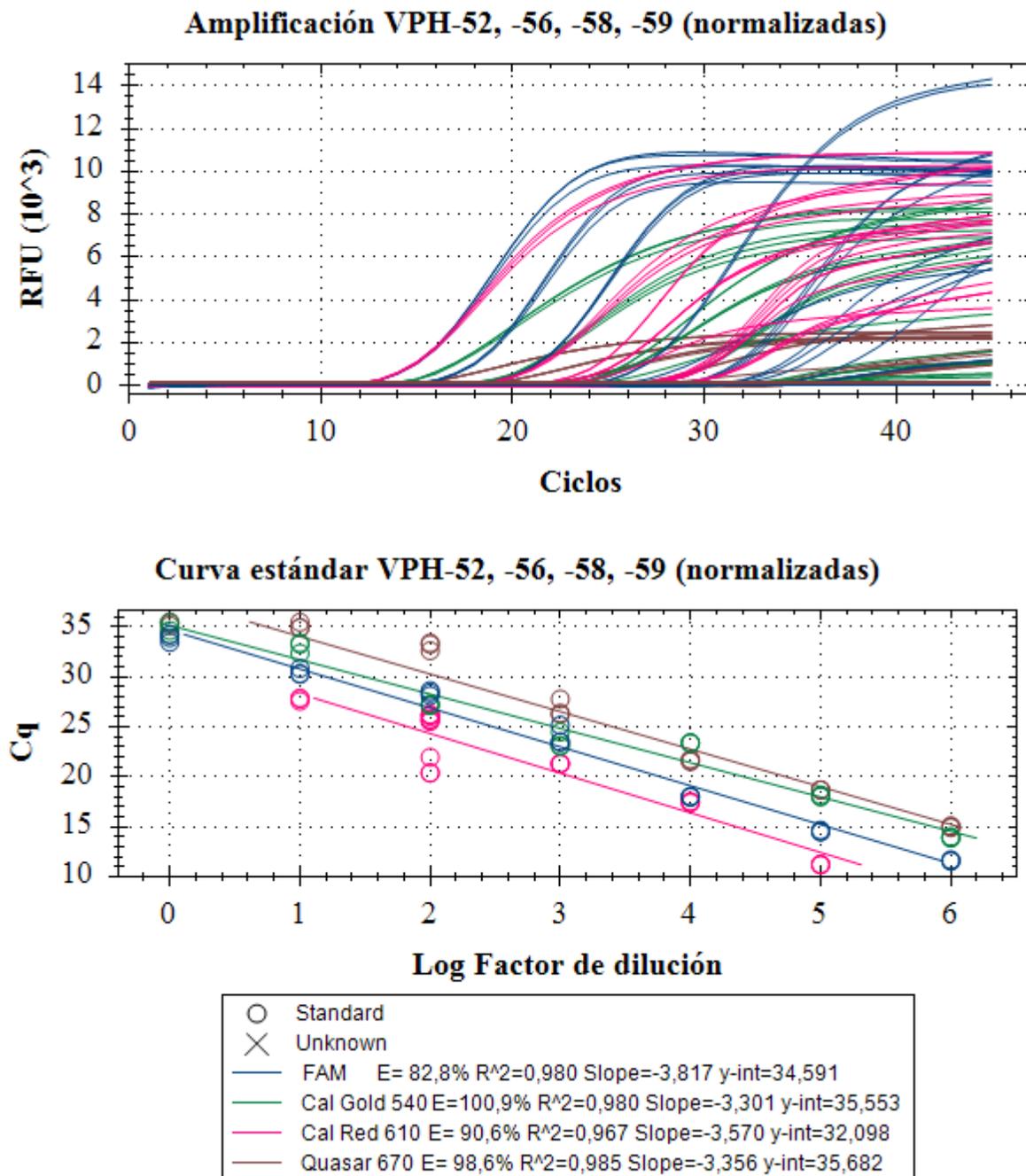
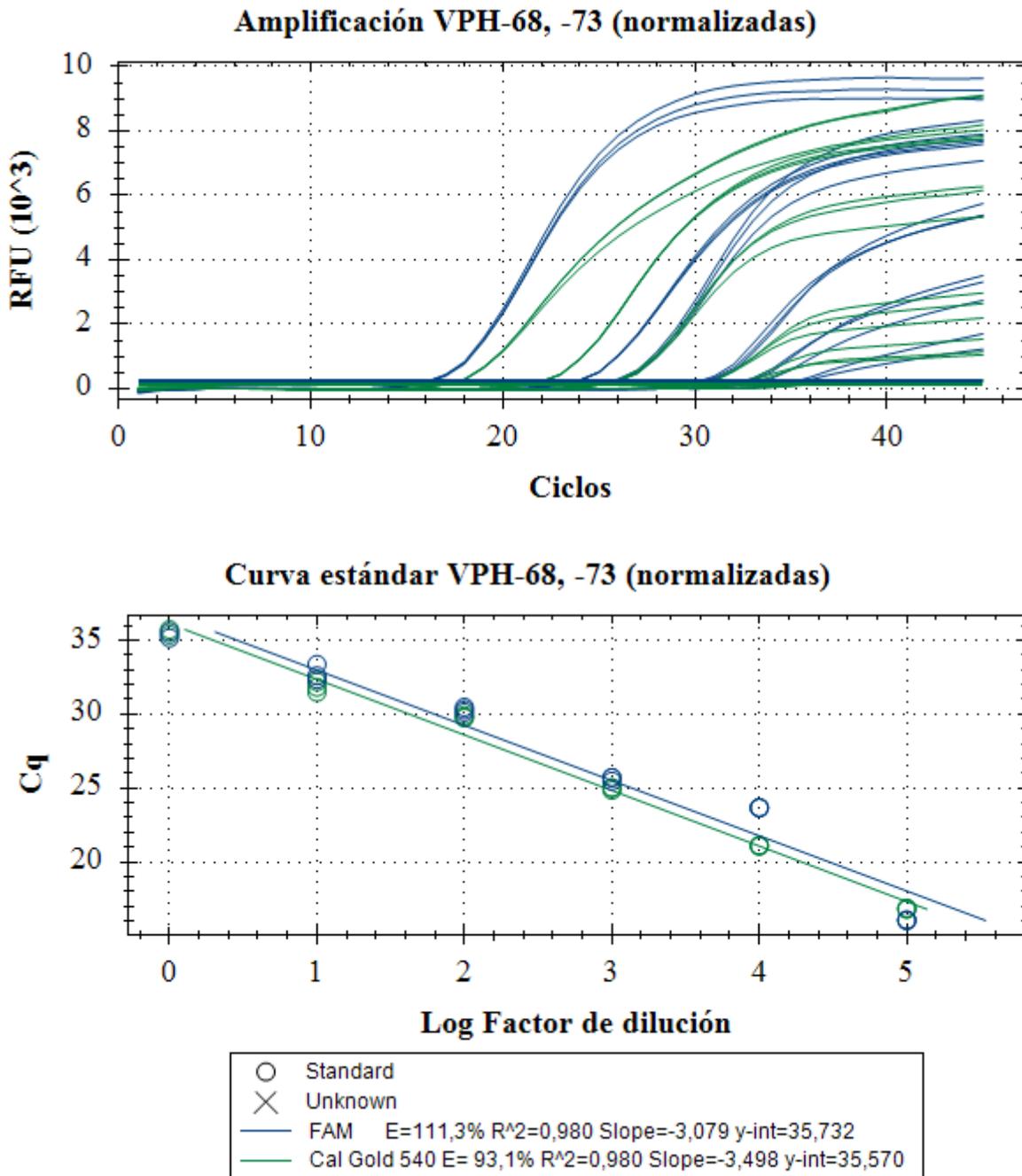


Figura 35.

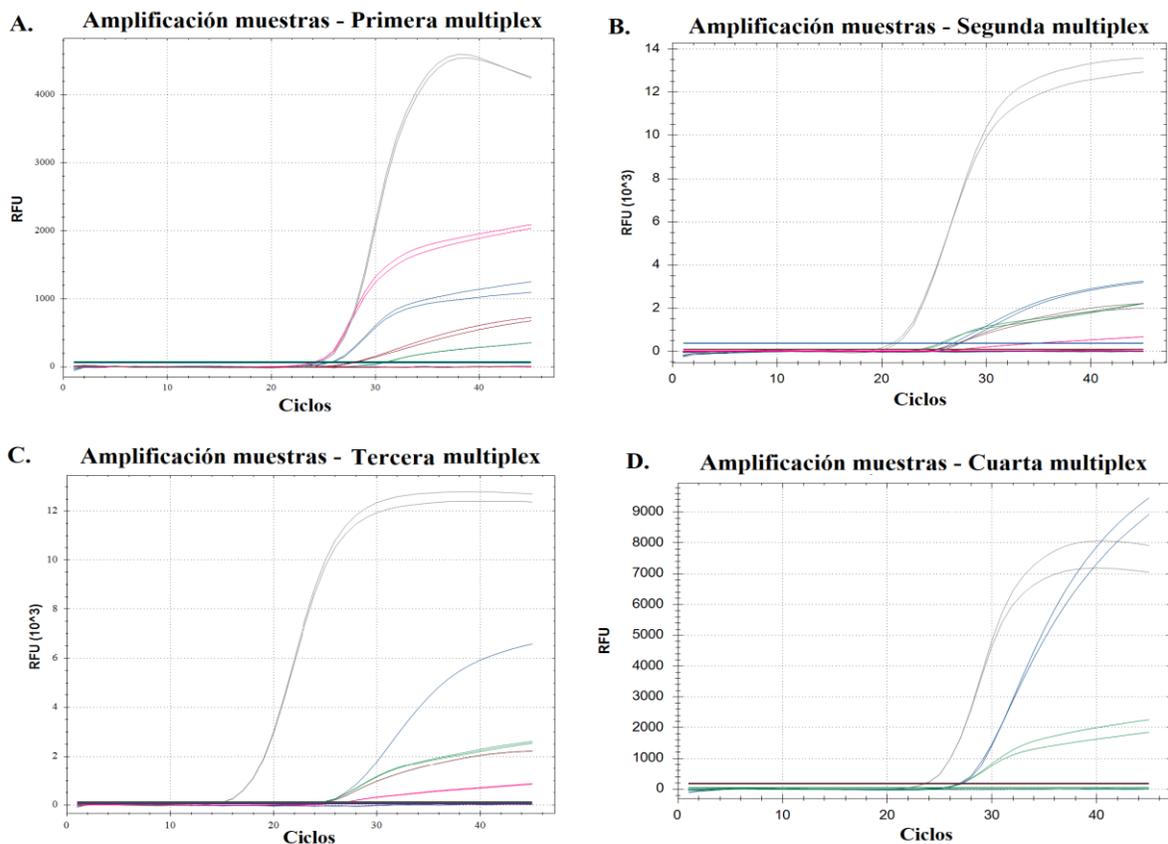
Curvas de amplificación y estándar de la cuarta qPCR multiplex de E7 de VPH-AR post normalización por ddPCR



Posteriormente, al probar las cuatro qPCR multiplex con grupos de DNA extraído de muestras cervicovaginales, de las cuales se conocía previamente el genotipo infectante, se logró cuantificar el número de copias de E7 de los 14 genotipos de VPH-AR (Figura 36, Tabla 13).

Figura 36.

Curvas de amplificación de las cuatro qPCR multiplex de E7 de VPH-AR con muestras cervicovaginales agrupadas



Nota: **A.** Ciclos umbrales de la primera multiplex: VPH-16 (Azul) = 26,88-27,07; VPH-18 (Verde) = 31,09-31,04; VPH-31 (Magenta) = 24,21-24,42; VPH-33 (Marrón) = 28,12-28,07; y Beta-tubulina (Gris) = positivo. **B.** Ciclos umbrales de la segunda multiplex: VPH-35 (Azul) = 21,07-21,41; VPH-39 (Verde) = 23,58-24; VPH-45 (Magenta) = 25,53-25,66; VPH-51 (Marrón) = 25,24-25,33; y Beta-tubulina (Gris) = positivo. **C.** Ciclos umbrales de la tercera multiplex: VPH-52 (Azul) = 24,48; VPH-56 (Verde) = 24,77 - 24,63; VPH-58 (Magenta) = 25,67-25,38; VPH-59 (Marrón) = 25,03-25,03; y Beta-tubulina (Gris) = positivo. **D.** Ciclos umbrales de la cuarta multiplex: VPH-68 (Azul) = 26,85-27,06; VPH-73 (Verde) = 25,19-25,16; y Beta-tubulina (Gris) = positivo.

Tabla 13.*Resultados de la qPCR multiplex de E7 de VPH-AR con muestras agrupadas de pacientes.*

| Id muestra | Genotipo | Ciclo umbral Ct | Promedio Ct | Pendiente m | Intersección en Y | Eficiencia % | [Log ADN inicial] X | Número de copias/uL |
|-------------------|-----------------|------------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------|----------------------------|
| 7700100675 | VPH16 | 26,88 27,07 | 26,98 | -3,383 | 34,378 | 97,5 | 2,1882944 | 1,54E+02 |
| 7700101078 | VPH18 | 31,09 31,04 | 31,07 | -3,476 | 38,382 | 94 | 2,1050057 | 1,27E+02 |
| 7700101602 | VPH31 | 24,21 24,42 | 24,32 | -3,141 | 34,237 | 108,1 | 3,1588666 | 1,44E+03 |
| 7700101809 | VPH33 | 28,12 28,07 | 28,10 | -3,572 | 35,428 | 90,5 | 2,0529115 | 1,13E+02 |
| 7700101020 | VPH35 | 21,07 21,41 | 21,24 | -3,453 | 37,545 | 94,8 | 4,7219808 | 5,27E+04 |
| 7700101716 | VPH39 | 23,58 24,00 | 23,79 | -3,157 | 36,422 | 107,4 | 4,0012670 | 1,00E+04 |
| 7700101839 | VPH45 | 25,53 25,66 | 25,60 | -3,145 | 34,560 | 107,9 | 2,8505564 | 7,09E+02 |
| 7700100373 | VPH51 | 25,24 25,33 | 25,29 | -3,532 | 34,183 | 91,9 | 2,5192525 | 3,31E+02 |
| 7700102272 | VPH52 | 24,48 24,48 | 24,48 | -3,817 | 34,591 | 82,8 | 2,6489389 | 4,46E+02 |
| 7700102200 | VPH56 | 24,77 24,63 | 24,70 | -3,301 | 35,553 | 100,9 | 3,2877915 | 1,94E+03 |
| 7700101411 | VPH58 | 25,67 25,38 | 25,53 | -3,570 | 32,098 | 90,6 | 1,8411764 | 6,94E+01 |
| 7700102076 | VPH59 | 25,03 25,03 | 25,03 | -3,356 | 35,682 | 98,6 | 3,1740166 | 1,49E+03 |
| 7700101640 | VPH68 | 26,85 27,06 | 26,96 | -3,079 | 35,732 | 111,3 | 2,8506008 | 7,09E+02 |
| 7700101393 | VPH73 | 25,19 25,16 | 25,18 | -3,498 | 35,570 | 93,1 | 2,9716981 | 9,37E+02 |

Nota: Número de copias del oncogén E7 de cada genotipo de VPH-AR por 25 ng de ADN en 25 uL de volumen final de reacción

5. Discusión

5.1. Condiciones de la qPCR

La mezcla lista del sistema EvaGreen con la polimerasa de fusión Sso7d permitió estandarizar rápidamente el protocolo de amplificación individual de los 14 genotipos de VPH-AR. Igualmente, la mezcla lista para la estandarización de la PCR multiplex permitió una rápida obtención de resultados debido a que las concentraciones de dNTPs y cofactores fueron las ideales para amplificar y detectar los 5 objetivos en una sola reacción, disminuyendo la necesidad de optimizar las concentraciones de buffer, enzima o cebador.

Durante la estandarización se utilizaron las mismas diluciones seriadas hasta un máximo de 6 veces. Esto hizo que las curvas se movieran hacia la derecha, aumentando el ciclo umbral de cada estándar, dejando ver el efecto del congelamiento-descongelamiento en la degradación de los patrones. Para asegurar la estabilidad del ADN en los estándares más diluidos y la cantidad de copias del gen a lo largo del tiempo, se disminuyó el tiempo de vórtex a 10 seg, se alicuotaron soluciones madre concentradas de cada genotipo y se hicieron diluciones nuevas cada dos corridas, descongelando los estándares sólo una vez.

Tras la secuenciación, se transformaron nuevamente bacterias competentes a partir del plásmido con el genotipo confirmado para mantener una reserva. Posteriormente, estos plásmidos se utilizaron para hacer nuevas diluciones estándar y todos funcionaron adecuadamente al probarlos en la qPCR, excepto el plásmido con los ORF E6/E7 de VPH-51. Por lo que se pudo evidenciar que, incluso manteniendo los procedimientos estandarizados y siguiendo las especificaciones del fabricante del kit de aislamiento, no siempre los resultados son reproducibles.

Con respecto a esto, se ha encontrado que cada uno de los pasos para obtener el ADN plasmídico puede estar sesgado en diferentes niveles, por ejemplo, pueden producirse variaciones en las bacterias portadoras del plásmido, cambios en la estabilidad de los plásmidos a lo largo del tiempo y otros factores difíciles de prevenir (Beinhauerova et al., 2020).

Según esto, sería posible encontrar heterogeneidad en las curvas de calibración al cambiar de plásmido y, por lo tanto, en las cuantificaciones extrapoladas a partir de esta. Sin embargo, este posible efecto no se midió ya que después de estandarizar las condiciones de amplificación, se usaron diluciones provenientes de alícuotas del mismo plásmido.

5.2. Comparación de qPCR utilizando estándares plasmídicos circulares y lineales

La cuantificación absoluta por qPCR depende de una curva de calibración construida a partir de estándares con un número conocido de copias de ADN. La precisión en el número de copias de ADN puede verse alterada si existe algún error de medición de los estándares de ADN. Las curvas de calibración se construyen utilizando productos de PCR, oligonucleótidos sintetizados, ADN genómico, ADN complementario o, más comúnmente, ADN plasmídico, debido a su fácil obtención y manipulación (Hou et al., 2010).

Conociendo que el ADN plasmídico extraído de *Escherichia coli* se encuentra en altos niveles de superenrollamiento (Rovinskiy et al., 2019), que es vulnerable al calor, al cizallamiento mecánico y al congelamiento-descongelamiento, y teniendo en cuenta la cantidad de plásmido en los estándares más concentrados, se consideró que esto podría estar dificultando la desnaturalización completa del ADN y posiblemente evitando que una gran parte de la secuencia

diana no se amplifique. Por esta razón se aumentó el tiempo de desnaturalización inicial, al no encontrar diferencias en los resultados y buscando aumentar la precisión y sensibilidad del ensayo, se digirió enzimáticamente el plásmido antes de la amplificación, intentando mejorar la disponibilidad del fragmento diana y la accesibilidad de los cebadores, la sonda y la polimerasa. Sin embargo, no se observaron diferencias en los ciclos umbrales de amplificación entre los estándares con plásmidos digeridos versus los no digeridos.

En este sentido, se ha demostrado que los diferentes tipos estructurales de ADN (circular o lineal) utilizados como estándares podrían afectar la precisión de la cuantificación por qPCR. Hou y colaboradores, describieron que la concentración del gen *pcna* de microalgas determinado por qPCR utilizando plásmidos en forma circular fue menor en comparación con la forma lineal, sobreestimando el número de copias del gen hasta en 6 veces (Hou et al., 2010). De manera similar, en un ensayo de qPCR del gen de la sintasa de almidón de maíz (*zSSIb*), se observó un aumento de 3 veces el número de copias usando plásmidos lineales (Lin et al., 2011).

Ante tales sobreestimaciones en las cuantificaciones, se esperaría encontrar bajas eficiencias de amplificación al utilizar estándares de ADN plasmídico superenrollado, sin embargo, no es así. Esto se podría explicar utilizando el modelo propuesto por Nedelman y colaboradores en el que existen tres tipos de amplicones: ADN nativo (tipo 1), productos largos (tipo 2) y productos cortos (tipo 3) (Nedelman et al., 1992). El ADN nativo, en este caso el ADN plasmídico, predomina en el primer ciclo, los productos largos aparecen a partir del segundo y los productos cortos a partir del tercero. A medida que avanza el ciclaje, el ADN plasmídico se mantiene constante, se diluye en la reacción y predominan los productos cortos. De tal manera, se puede sugerir que a pesar de

que claramente existe una disminución en la eficiencia, esta no se alcanza a detectar, puesto que la dificultad para amplificar la secuencia diana ocurre en la etapa más temprana de la PCR, cuando solo está presente el plásmido superenrollado, mientras que en los ciclos posteriores la eficiencia de amplificación se mantiene dentro del rango aceptable gracias a los otros dos tipos de amplicones.

Por otra parte, también se ha demostrado que los estándares de plásmidos circulares no siempre conducen a grandes sobreestimaciones. Esto se comprobó amplificando el gen de rRNA 16S en modelos procariotas, ya que cuentan con genomas y plásmidos circulares. En estos modelos las estimaciones del número de copias de los genes fueron similares con estándares circulares y lineales (Oldham & Duncan, 2012).

A pesar de lo esperado en este ensayo, la eficiencia, la precisión y el rango lineal de la cuantificación del oncogén E7 de VPH-AR no se vieron afectados por la conformación del ADN. Esto podría explicarse por la posibilidad de que el ciclo de desnaturalización inicial fuera suficiente para liberar el superenrollamiento del plásmido al introducir roturas en la hebra de ADN en las etapas tempranas de la PCR o porque se lograra la amplificación a partir del plásmido superenrollado gracias a la polimerasa de fusión Sso7d que tiene alta efectividad amplificando regiones con estructuras secundarias fuertes.

Sin embargo, dada la amplia evidencia que indica que la conformación del ADN tiene un impacto notable en la amplificación por qPCR, debe considerarse una posible digestión insuficiente del plásmido, ya sea por el tiempo de digestión o por diferentes propiedades de la

enzima, por ejemplo, dado que el sitio de corte de la enzima de restricción no se da exactamente en las regiones flanqueantes de los cebadores, esto da como resultado fragmentos tipo 2 y tipo 3 de diferentes longitudes según el genotipo viral, y estos fragmentos también pueden estar formando estructuras secundarias lo que disminuiría el propósito de la digestión con enzimas de restricción antes de la amplificación.

5.3. ddPCR para la verificación de concentraciones de E7 en los estándares utilizados en la qPCR multiplex de E7

Para la qPCR es primordial que se conozca exactamente el número de copias de los estándares utilizados. Generalmente, para conocer la concentración de ácidos nucleicos se utiliza la espectrofotometría o la fluorometría, una vez se conoce la concentración de ADN es posible calcular el número de copias de la secuencia diana teniendo en cuenta el peso molecular del plásmido (Kline et al., 2009; Whelan et al., 2003). No obstante, las mediciones de absorbancia pueden variar por diferentes razones, una de ellas es la contaminación con proteínas, solventes, ARN y sales, disminuyendo la pureza del ADN de interés y alterando el número de copias calculado de la secuencia diana provocando la construcción de estándares imprecisos (Sanders et al., 2011).

Por esta razón, se utilizó la tecnología de PCR digital basada en gotas (ddPCR) para verificar las concentraciones de los estándares de cada genotipo utilizado en la qPCR multiplex de E7. La ddPCR no depende de estándares para dar una cuantificación, se basa en la tecnología de gotas de emulsión de agua en aceite, divide una muestra hasta en 20.000 gotas y en cada gota amplifica el objetivo, al contar las gotas positivas se obtiene la cuantificación absoluta de la secuencia de interés

(Hindson et al., 2011). Además, se ha encontrado concordancia en la concentración del número de copias del plásmido calculada por ddPCR con la determinada por espectrometría de masas por dilución de isótopos y cromatografía líquida (LC-IDMS), por lo que ha demostrado ser un método de cuantificación absoluta, precisa y fiable (Dong et al., 2014).

Al amplificar por ddPCR la dilución 10^3 de cada genotipo, en todos los casos se obtuvieron cuantificaciones por debajo de las 208 copias/ μ L esperadas. Además de las posibles impurezas en el ADN, las diferencias entre la cuantificación calculada por espectrofotometría y la estimada por ddPCR pueden deberse a muchos otros factores, incluso podrían ser ocasionadas por variaciones en los instrumentos, por la utilización de diferentes reactivos (Bustin et al., 2009), o por la cuantificación del plásmido sin el inserto. En este aspecto, tanto el vector pMinit2.0 como el TOPO TA tienen mecanismos que evitan la formación de colonias cuando el vector se recirculariza sin el inserto, no obstante, podría encontrarse el vector lineal aunque es probable que no afecte mayormente la concentración (P. Bernard et al., 1994).

Adicionalmente, se ha visto que el método para extraer el ADN plasmídico puede afectar considerablemente la cuantificación y alterar el cálculo final de copias de la secuencia de interés (Smith et al., 2006). En una investigación reciente se probaron seis kits comerciales de extracción de ADN plasmídico, incluido el usado en este estudio, los resultados mostraron diferencias aleatorias en las estimaciones de concentración por lo que se sugirió que no se estaba aislando sólo el ADN plasmídico sino también una proporción de ADN cromosómico (Beinhauerova et al., 2020). Según esto, el ADN cromosómico pudo sobrevalorar la concentración de plásmido obtenida

en el Nanodrop, afectando a su vez el cálculo del número de copias del gen E7, lo que finalmente alteró las diluciones estándar de cuantificación de la qPCR.

En este contexto, para garantizar la precisión de la cuantificación por qPCR y para permitir la comparación interlaboratorio de los datos cuantitativos, es importante que se estandaricen los protocolos que faciliten la verificación de la cantidad real de ADN objetivo en las diluciones estándar. De otra manera, al utilizar instrumentos de medición poco adecuados para este propósito, inadvertidamente, se estaría introduciendo un sesgo de información en la interpretación de resultados, ya sea sobreestimando o subestimando los resultados experimentales. Incluso se ha encontrado que al hacer comparaciones intralaboratorio pueden existir diferencias en las cuantificaciones de los estándares en el tiempo, lo que finalmente se traduce en un sesgo en los resultados cuantitativos de las secuencias de interés (Beinhauerova et al., 2020). Por lo que claramente es necesario hacer controles rutinarios de cada lote de reactivos y verificar la concentración de los estándares.

Por todo lo anterior, para efectos de la cuantificación de los estándares utilizados en la curva de calibración de las qPCR no se recomiendan las mediciones basadas en la absorbancia. Por otra parte, la ddPCR funciona como una herramienta de cuantificación absoluta más precisa y permite que las diluciones que se hagan a partir de esta estimación sean más exactas. Esta técnica podría funcionar como una herramienta para el control de calidad de la cantidad de copias de la secuencia objetivo en los estándares a lo largo del tiempo y del lote de cebadores puesto que se utilizan los mismos que en la qPCR. Finalmente, se ganaría homogeneidad y reproducibilidad en los resultados permitiendo comparaciones más confiables intra e interlaboratorios.

En un estudio sobre el sesgo de cuantificación en qPCR se ha sugerido que cada paso que involucre a los estándares, desde la conformación del plásmido hasta el almacenamiento del ADN, incluyendo la preparación, cuantificación, purificación y manipulación, también se debe describir en la guía de Información mínima para la publicación de experimentos cuantitativos de PCR en tiempo real (MIQE) (Lin et al., 2011).

En consecuencia, se debe tener en cuenta que para llevar a cabo la ddPCR fue necesario linealizar los plásmidos estándar usando enzimas de restricción con el fin de evitar el efecto de lluvia que dificulta establecer el ciclo umbral en la ddPCR y que ha sido reportado en otros estudios (Beinhauerova et al., 2020; Dong et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, la conformación del ADN plasmídico también puede tener efectos sobre la precisión de la cuantificación absoluta de la qPCR. Por esta razón, para evitar sesgos con respecto a la conformación del plásmido, en las curvas de calibración de la qPCR construidas tras la normalización de la concentración de los estándares, se utilizaron los mismos plásmidos digeridos que se usaron en la ddPCR.

En resumen, aunque la eficiencia y la precisión no se vieron afectadas por la sobrestimación en la concentración de los estándares, el rango lineal sí cambió significativamente entre las curvas con los estándares de plásmidos cuantificados por espectrofotometría y por ddPCR, reflejándose en una disminución en la sensibilidad de cuantificación del oncogén E7 de los 14 genotipos de VPH-AR.

5.4. Fluorescencia durante la qPCR

Al comparar las RFU detectadas tras la amplificación del genotipo VPH-68 antes y después de hacer el cambio de sonda y de cebador directo para este genotipo, se pudo evidenciar que hubo un aumento de 4.000 a 10.000 RFU (Apéndice M). Teniendo en cuenta que la señal fluorescente emitida se da como resultado de la hidrólisis de la sonda, y que esta fluorescencia es proporcional al producto de PCR acumulado, este aumento en la fluorescencia probablemente se debe a que la primera sonda utilizada no se unía eficientemente a la secuencia objetivo, ya sea por las inconcordancias encontradas en algunos nucleótidos o por formación de estructuras secundarias. El diseño de la sonda está pensado para que esta se hibride a la secuencia diana antes que los cebadores, si sólo se unen los cebadores, habrá amplificación, pero esta no será eficientemente cuantificada por medio de la fluorescencia.

Igualmente, las RFU antes y después de la normalización de VPH-51 aumentaron aproximadamente tres veces (Apéndice H). Esto podría explicarse por un cambio de lote de la sonda o un cambio en la concentración. Sin embargo, en ambos casos se utilizó la misma alícuota de sondas. Cabe resaltar que inicialmente, se probaron las sondas por separado, posteriormente se hicieron alícuotas de las sondas multiplexadas con el fin de servir más eficientemente la mezcla de reacción. Es probable que al mutiplexar las sondas, esta se estuviera inhibiendo o formando heterodímeros. Sin embargo, pensamos que esta no es la explicación porque desde el inicio se evidenció una baja fluorescencia al amplificar este genotipo, por otra parte, si fuera un inconveniente al multiplexar, se esperaría que otro genotipo de esa multiplex presentara el mismo problema.

Dado que la fluorescencia aumentó después de la recalibración y que las condiciones de concentración y multiplexación de la sonda fueron las mismas antes y después, el único factor que pudiera estar influenciando esta variación es la linealización de los plásmidos. El hecho de que este efecto tan marcado no se observa en las amplificaciones de otros genotipos podría explicarse por el tamaño del vector de clonación utilizado (TOPO). Esto dio como resultado un plásmido ligeramente más largo (4,8 kb) que los demás (3,3 kb), por lo que es probable que en las etapas tempranas de la qPCR la región diana de la sonda fuera más accesible después de la linealización del plásmido, aumentando la eficiencia de unión de la sonda y, por consiguiente, la amplitud de la fluorescencia.

Notoriamente, las sondas marcadas con el fluoróforo Quasar 670 fueron aquellas que emitieron una menor fluorescencia (Apéndices D, H y L), por lo que, podría ser la naturaleza de este fluoróforo, aunque no se debe descartar un inadecuado marcaje de estas sondas.

Finalmente, el aumento en la fluorescencia evidenciado en la amplificación de VPH-16 (Apéndice A) se debe al ajuste en las concentraciones de los estándares después de la ddPCR, como se mencionó, y a un aumento en la eficiencia de la amplificación, lo cual se amplía en el siguiente apartado.

5.5. Eficiencia de la qPCR

La eficiencia de amplificación de la qPCR es del 100% cuando el número de copias de la secuencia objetivo se duplica en cada ciclo de replicación. Generalmente, se recomiendan eficiencias entre el 90 y 110% (Bustin et al., 2009). Sin embargo, se encontró una eficiencia de

71,9% al amplificar por primera vez VPH-16 con el sistema EvaGreen (Figura 11). Una de las razones por las que se pueden encontrar eficiencias bajas de amplificación es el diseño subóptimo de los cebadores (S. Bustin & Huggett, 2017), pensamos que esta pudo haber sido la causa puesto que al amplificar nuevamente este genotipo con cebadores cuyo producto amplificado fue más corto, la eficiencia aumentó a 102,9%. Sin embargo, también es posible encontrar eficiencias bajas cuando existen inhibidores en la reacción, errores de pipeteo e inconsistencias en las diluciones (Svec et al., 2015). Se descartó la presencia de inhibidores midiendo la calidad de ADN por medio de espectrofotometría y se hicieron nuevas diluciones del plásmido a partir de las concentraciones normalizadas.

En la ddPCR se evidenció una sobreestimación mayor en la concentración de copias de E7 de VPH-16 que para el resto de los genotipos (Figura 31). De tal forma que, constantemente se estuvo pipeteando el estándar de manera insuficiente en la dilución en serie, por esto, aunque el valor de R^2 fue bueno, la pendiente de la curva se hizo más negativa y esto se vio reflejado en el cálculo de una menor eficiencia de amplificación de la PCR.

De igual manera, se encontró una baja eficiencia de amplificación para VPH-52 en la qPCR multiplex después de la normalización de las concentraciones de los estándares (Figura 34). Esta baja eficiencia no se atribuye al diseño de los cebadores puesto que previamente funcionaron correctamente en el sistema con EvaGreen (Figura 19). Sin embargo, en la qPCR multiplex la eficiencia estuvo por encima de lo recomendado (Apéndice I). Por lo que se puede considerar escoger un rango de diluciones que funcione mejor para trazar la curva estándar de este genotipo, ya que al escoger diluciones tan bajas estas tendrán ciclos umbrales muy altos que pueden

aumentar o disminuir la pendiente y provocar que la reacción no sea eficiente, este comportamiento estocástico es propio de la distribución de Poisson, la homogeneidad de la dilución y la técnica de pipeteo (Best et al., 2015).

Por el contrario, se evidenció una eficiencia ligeramente por encima de lo recomendado al amplificar VPH-68 tras la normalización de las concentraciones de los patrones (Apéndice M). Debido a que en la curva estándar se observan varios puntos por encima y por debajo de la línea, muy probablemente la variación en la eficiencia se deba a la precisión en el pipeteo y al cambio de micropipetas. Además, el punto que corresponde a la dilución más concentrada (10^5), se encuentra por debajo de la región lineal, indicando que posiblemente se está excediendo el rango dinámico al utilizar una reacción saturada con un número elevado de copias de la secuencia objetivo (*QPCR Technical Guide*, 2008). Para solucionar esta situación, se deben hacer nuevamente las diluciones de los estándares usando la micropipeta habitual calibrada.

5.6. Sensibilidad analítica de la qPCR

Se refiere a la fase cuantitativa y detectable, es decir al número mínimo de copias de una secuencia objetivo que se puede medir con precisión (Bustin et al., 2009). Generalmente, la sensibilidad analítica se denota como el límite de detección (LOD), el cual hace referencia a la concentración detectable con una probabilidad del 95% con un determinado procedimiento analítico (Bustin et al., 2009). Comúnmente, esta fase abarca concentraciones de ADN entre 10^2 y 10^8 copias del ácido nucleico.

El LOD más sensible teóricamente posible es de 3 copias, asumiendo una distribución de Poisson, con un 95% de probabilidad de incluir al menos 1 copia en la PCR y de detectarla (Bustin et al., 2009). En este ensayo, después de la normalización de las concentraciones de los estándares el LOD de E7 de VPH-AR disminuyó en todos los genotipos mejorando la sensibilidad de detección desde 1 a 10 copias dependiendo del genotipo.

En cuanto al límite superior de la qPCR multiplex, es posible determinar hasta una concentración de 10^5 copias del gen E7 de los 14 genotipos de VPH-AR manteniendo los rangos de eficiencia recomendados. Por encima de este valor el «ruido de fondo» disminuye hasta hacerse indeterminado, perjudicando la eficiencia de amplificación (*QPCR Technical Guide*, 2008), por lo que, si se llegara a encontrar una muestra por encima de este valor, es decir, que exceda el rango lineal debido a la saturación con ADN objetivo, habría que hacer una dilución y tenerla en cuenta si se quiere obtener la cuantificación final.

Teniendo en cuenta que no se tiene un precedente de otras qPCR para VPH en las que se haga este tipo de recalibración, las cantidades de ADN que se determinen con la qPCR multiplex de E7 y las calculadas en diferentes laboratorios se deben comparar cuidadosamente ya que no se presentan en el “mismo idioma”.

Actualmente, existen kits de genotipificación de VPH con diferentes sensibilidades aprobados por la FDA que utilizan una variedad de instrumentos de medición: 1) La captura híbrida 2 (HC-2) detecta 13 VPH-AR desde 5000 copias por ensayo (Terry et al., 2001). Sin embargo, HC-2 no tiene controles internos para evaluar la calidad de la muestra, mientras que la

qPCR multiplex de E7 incluye un control interno en cada multiplex para ver si las muestras contienen inhibidores de la PCR. Además, los principales genotipos, VPH-16 y -18 pueden detectarse simultáneamente en la primera multiplex; 2) El ensayo Abbott RealTime High-Risk HPV (Abbott Laboratories) detecta 14 genotipos de VPH-AR, no obstante no permite establecer el número de copias del virus al ser una prueba cualitativa; 3) Cobas HPV Test (Roche Diagnostics) detecta 12 genotipos de VPH-AR por medio de PCR en tiempo real, sin embargo, no utiliza cebadores específicos para cada genotipo; y 4) Cervista HPV HR (Hologic), también es una prueba de diagnóstico cualitativa para la detección de 14 VPH-AR (Rincón et al., 2017).

Adicionalmente, se calcula que existen más de 193 pruebas comerciales de VPH en el mercado (Poljak et al., 2016). Por lo que es necesario realizar la validación de la qPCR de E7 y pruebas comparativas para evaluar las ventajas relativas de cada sistema.

5.7. Variabilidad del oncogén E7 de algunos VPH-AR

Según el Comité de Nomenclatura un nuevo genotipo de VPH es aquel cuya secuencia de nucleótidos varía en más del 10% en los ORF de E6, E7 y L1 en comparación con la de otros genotipos. Se denominan subtipos si difieren entre un 2 y 10%, y variantes intratipo si varían hasta un 2% en la región codificante y hasta un 5% en la región no codificante (H. U. Bernard et al., 1994; de Villiers, 1994).

Según estas proporciones existen seis variantes de VPH-16 nombradas por su distribución geográfica como: Europea, Asiático-americana, Africana 1, Africana 2, Asiática y Norteamericana (Wheeler et al., 1997; Yamada et al., 1997). Las variantes pueden tener diferentes potenciales

oncogénicos (Sathish et al., 2005; Yamada et al., 1997), influir en la persistencia de la infección por VPH y en la progresión de las lesiones precursoras del cáncer (Zehbe et al., 1998), también pueden afectar el ensamblaje del virus, la respuesta inmunológica, la patogenicidad, la degradación de p53, la actividad de inmortalización y la regulación de la transcripción (Sunthamala et al., 2014; Westrich et al., 2017). Igualmente, los métodos diagnósticos basados en PCR se ven afectados en cuanto a sensibilidad y especificidad de detección.

En varias etnias y regiones geográficas del mundo se ha informado una baja frecuencia de la mutación del oncogén E7 de VPH-16. Contrariamente, algunos estudios, en su mayoría de Asia Oriental, han informado en pacientes con CCU una frecuencia de mutación de 65 a 75% en este gen (de Boer et al., 2004), y particularmente en China, se reportaron variaciones de secuencia del ORF de E7 de VPH-16 en el 100% de los casos con CCU (Wu et al., 2006). En contraste, en un estudio de India se encontró que el gen E7 estuvo altamente conservado; el 86,7% de los pacientes no mostró variación en los nucleótidos y el 13,3% restante tuvo mutaciones silenciosas (Pande et al., 2008).

Se ha reportado que la variación de E7 de VPH-16 más frecuentemente notificada es la A647G (Zhe et al., 2019), sin embargo, encontramos que en la muestra seleccionada para este estudio estuvo ausente. No obstante, se presentó la inserción de dos Ácidos glutámicos en las posiciones 33 y 34 de este oncogén, estas mutaciones no han sido reportadas hasta el momento para el genotipo VPH-16, y es importante aclarar que ninguna está dentro del objetivo de amplificación de la qPCR-E7.

De manera interesante, en un numeroso estudio de casos y controles, en donde los casos fueron pacientes con CCU por VPH-16 y los controles fueron mujeres infectadas con VPH-16 sin CCU, se encontró que la variación genética viral influyó en el riesgo de pre-CCU y CCU (Mirabello et al., 2017). Los controles tuvieron más mutaciones que llevaron a cambios de aminoácidos en todo el genoma y, particularmente, no se encontraron variantes en el gen E7 de VPH-16 en los casos de pre-CCU y CCU (Mirabello et al., 2017). Además, un gran porcentaje de las mutaciones de los controles (58%) coincidió con un motivo asociado a APOBEC3 y esto estaría conduciendo potencialmente la actividad antiviral de APOBEC3. Por lo tanto, “la conservación estricta de los 98 aminoácidos de E7 es fundamental para la carcinogénesis de VPH-16, ya que presenta un objetivo muy específico para la investigación etiológica y terapéutica” (Mirabello et al., 2017).

En cuanto a VPH-45, uno de los genotipos pertenecientes al grupo alfa-7, relacionado con VPH-18, y que representa aproximadamente el 5% de todos los casos de CCU en el mundo, se han identificado 43 variantes que forman 5 sublinajes filogenéticos basado en E6 y E7: A1, A2, A3, B1 y B2 (A. A. Chen et al., 2014). Entre 192 casos de CCU y 101 controles (otorgados por la IARC), el sublinaje B2 estuvo significativamente sobrerrepresentado en el CCU, tanto en general como en Sudamérica por separado (A. A. Chen et al., 2014). Cabe resaltar que, entre los 8 países sudamericanos no está incluido Colombia, lo que pone de manifiesto que en nuestro país es importante fortalecer los estudios genómicos virales, especialmente para identificar la evolución y las bases genéticas de la carcinogenicidad de los VPH-AR.

En la muestra secuenciada en este estudio se encontraron dos Polimorfismos de nucleótidos únicos (SNP, del inglés Single Nucleotide Polymorphism) que llevan a las sustituciones E6A y E82D. Estas mutaciones se pudieron encontrar en todos los sublinajes mencionados, es decir, no son exclusivas ni tampoco discriminan un sublinaje de otro (A. A. Chen et al., 2014). Sin embargo, se observa que en el linaje B todas las muestras incluidas tienen ambos SNP y este linaje es el que tiene una mayor representación en América del Sur.

En Costa Rica se realizó el único estudio sudamericano sobre linajes y resultados de la infección por VPH-AR. En este estudio se informó que los linajes B de VPH-45 podrían estar asociados con infección persistente y desarrollo de NIC-3+. Sin embargo, los resultados no fueron significativos (Schiffman et al., 2010). Posteriormente, Chen y colaboradores, sugirieron que el sublinaje B2 puede estar asociado con un mayor riesgo de CCU (A. A. Chen et al., 2014).

Para el caso de VPH-52, perteneciente al grupo alfa-9, uno de los genotipos de alto riesgo más prevalentes en Asia y el segundo más frecuente aquí en Bucaramanga (Hirose et al., 2018; Torrado et al., 2018), se encontraron dos SNP que dan como resultado mutaciones sinónimas. Según un estudio sobre variaciones de nucleótidos de alta frecuencia detectadas en muestras clínicas con VPH-AR, este tipo de mutaciones no son las más comunes, sino aquellas en las que se ve involucrado el mecanismo de edición de APOBEC, es decir, sustituciones C-a-T y C-a-G que provocan sustituciones no sinónimas y que podrían afectar las funciones de las proteínas virales (Hirose et al., 2018).

Por otra parte, se encontraron cuatro mutaciones en el oncogén E7 de VPH-56. Según los análisis del primer estudio que evaluó la variación genética de VPH-56 en el suroeste de China, dos de estas mutaciones ocurren en puntos en donde existe presión selectiva (12V y 77Q). Particularmente, los análisis bioinformáticos sugieren que la sustitución Q77H puede tratarse de una mutación dañina que ocurre en la hoja β de E7, lo que afectaría la estructura y la función de la oncoproteína E7 (Jing et al., 2018).

En un estudio sobre filogenia y polimorfismo de los genes E6 y E7 de VPH-AR en mujeres de Shanghai, se encontraron inserciones en la secuencia de E6 del genotipo VPH-59, sin embargo, nuevamente, la estricta conservación de E7 fue fundamental en el proceso de carcinogenicidad por VPH-AR (Zhao et al., 2019).

El genotipo VPH-68 fue aquél en el que se evidenció una mayor cantidad de mutaciones, esta singularidad concuerda con lo encontrado en un estudio sobre la prevalencia y variabilidad genética de los genes E6 / E7 de VPH-68 en Sichuan. En este estudio también se detectaron hasta 12 mutaciones no sinónimas en la región E7 que provocaron la modificación de la estructura proteica, afectando la patogenicidad de VPH-68: tres de las cuales fueron iguales a las secuenciadas en este estudio (C18Y, E91Q y T64R) y otras dos tuvieron lugar en la misma posición, pero dieron como resultado una sustitución diferente (T68A/M por T68L y L75P por L75A) (He et al., 2021). La variabilidad encontrada en los sitios de selección positivos del oncogén E7 de este genotipo de alto riesgo podría estar afectando su forma de adaptarse al medio ambiente por lo que se requiere de mayor investigación para enriquecer la discusión de esta hipótesis.

Finalmente, no se encuentran reportes previos sobre la variabilidad genética de VPH-73, posiblemente porque, a pesar de la reciente evidencia de sus características cancerígenas, las clasificaciones aún no lo consideran como un genotipo oncogénico propiamente dicho, sino como “probablemente carcinogénico” (Amaro-Filho et al., 2020). Sin embargo, en un estudio sobre la variación intratipo en 12 genotipos de VPH-AR se evidenció por primera vez la sustitución E80D en la proteína E7 de MM9/PAP238A, posteriormente denominado VPH-73 (Stewart et al., 1996). Además, recientemente se demostró la presencia e integración de ADN de VPH-73 y la actividad transcripcional en pacientes con CCU (Amaro-Filho et al., 2020), y se encontraron casos de NIC-2 y CCU por VPH-73 con resultados falsos negativos por medio de diferentes tecnologías diagnósticas, incluyendo, Cobas y HC-2 (Petry et al., 2016, 2017), por esta razón consideramos importante aumentar la vigilancia genómica e incluir este genotipo en el diagnóstico molecular actual, así como recomendar su consideración en la vacunación contra VPH.

Las mutaciones no reportadas hasta el momento requerirán de mayor investigación para conocer qué posibles alteraciones existen en la función biológica y oncogenicidad de las proteínas que pudiesen estar afectando la historia natural de la infección por VPH. Estos datos también serían de gran importancia en la comprensión de las diferencias geográficas y biológicas inherentes a los VPH-AR que circulan en Colombia; e incluso podrían mejorar la eficacia del diseño de vacunas para poblaciones específicas.

5.8. Cuantificación del oncogén E7

Además de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 que conducen a la transformación maligna, se ha demostrado que factores como la carga viral y la configuración del genoma viral

(episomal, integrado o mixto) pueden tener implicaciones en la persistencia de la infección por VPH-AR, en la progresión de las lesiones cervicales y en el desarrollo de CCU (Dalstein et al., 2003; Lorincz et al., 2002; Woodman et al., 2007).

La qPCR es un método altamente sensible, específico y reproducible que detecta y cuantifica ácidos nucleicos (Gebhart, 2014). Previamente se ha utilizado este método para establecer si el número de copias de ADN de VPH-AR es un predictor útil de la progresión a CCU, encontrándose que el hecho de conocer la carga viral puede mejorar la capacidad para estratificar las infecciones como de bajo o alto riesgo de progresión a CCU (Josefsson et al., 2000).

Se ha reportado que el número de copias de ADN viral varía dependiendo del genotipo de VPH y el grado de lesión cervical. Por ejemplo, para VPH-16, el promedio de copias de ADN aumenta con el grado de neoplasia (Swan et al., 1999). Sin embargo, la cuantificación del resto de genotipos de alto riesgo se ha visto limitada por la sensibilidad y especificidad de las pruebas utilizadas, ya que algunas, como HC-2, cuantifican en conjunto todos los VPH presentes y su rango de cuantificación no cubre el rango completo observado en muestras clínicas (10^2 a 10^9 copias) (Saban et al., 1996).

La diferencia en la carga viral según el genotipo de VPH-AR puede deberse a la diversidad de la respuesta inmune y a diferencias en la replicación viral (Swan et al., 1999). Esto puede deberse a que durante el proceso de replicación viral participan múltiples proteínas, y las más mínimas variaciones en estas proteínas y sus interacciones podrían verse reflejadas en grandes diferencias en la cantidad de ADN de VPH (Banks et al., 1990; Vousden, 1993).

Por otra parte, se sabe que a medida que aumenta la integración del genoma de VPH y el grado de neoplasia, disminuye la diferenciación celular y la transcripción viral general, incluso las transcripciones L2 y L1 pueden desaparecer completamente (Stoler et al., 1992). Es posible que se mantenga el ORF de L1 aunque no se transcriba, pero también es probable que las cuantificaciones reportadas por PCR de L1 no reflejen los números completos de copias de VPH (Tjalma & Depuydt, 2013). Consideramos que el oncogén E7, indispensable en la transformación maligna, es un objetivo que puede ofrecer una cuantificación más confiable y precisa de la carga viral de VPH.

Finalmente, a pesar de que existen reportes sobre la carga viral de algunos VPH-AR más frecuentes (Swan et al., 1999), faltan datos relacionados con el número de copias virales del resto de genotipos de alto riesgo. En este estudio ofrecemos una qPCR que permitirá conocer el número de copias del oncogén E7 de cada genotipo de alto riesgo en tejidos cervicales cancerosos y precancerosos, e incluso en el caso de infecciones con múltiples genotipos de VPH-AR se podrían distinguir las infecciones por VPH en progresión de aquellas que ya se encuentren en regresión, estableciendo el perfil de carga viral de cada genotipo específico.

6. Limitaciones

La limitación de este estudio fue la imposibilidad de incluir el genotipo VPH-82 (probablemente carcinogénico) en la qPCR multiplex de E7 de VPH-AR debido a la dificultad para conseguir una muestra con este genotipo. Sin embargo, considerando que en la cuarta qPCR multiplex se pueden incluir hasta dos genotipos más, una vez el grupo de investigación tenga acceso a una muestra con este genotipo se espera realizar la estandarización de la técnica.

7. Conclusiones

- Se construyeron 14 plásmidos con los genotipos de VPH-AR, los cuales funcionaron adecuadamente como estándares en la optimización de la qPCR multiplex del oncogén E7.
- La ddPCR permitió definir la cantidad de copias del gen E7 en los estándares de plásmidos de cuantificación y dio a conocer la sobreestimación en las concentraciones calculadas por espectrofotometría, mejorando la sensibilidad de la qPCR.
- Se estandarizaron cuatro qPCR multiplex de E7 para genotipificación y cuantificación de 14 genotipos de VPH-AR con eficiencias de amplificación entre el 82 y 111%; pendientes de la curva alrededor de -3,8 y -3,0 y coeficientes de correlación $R^2 > 0,97$. Por consiguiente, la qPCR multiplex de E7 permite determinar la carga viral específica de 14 genotipos de VPH-AR, dando a este ensayo potencial aplicabilidad en la estratificación del riesgo, en la determinación de la persistencia de infección por VPH-AR y en el seguimiento post-tratamiento.

8. Recomendaciones y perspectivas

Considerando los resultados del presente trabajo, la qPCR multiplex del oncogén E7 de 14 genotipos de VPH-AR desarrollada podría ser una herramienta diagnóstica altamente sensible, específica y de alto desempeño, que permitiría procesar un número elevado de muestras y contribuiría en la prevención del CCU. Por lo anterior, se espera continuar con un estudio de tecnología diagnóstica de fase 2 para realizar la validación de esta qPCR múltiplex en muestras reales de cérvix de mujeres obtenidas en estudios en curso por nuestro grupo de investigación.

Una vez se cuente con esta prueba de tamización validada, se espera que se pueda implementar en la práctica clínica como biomarcador para determinar la persistencia de infección por VPH-AR, estratificar el riesgo por medio de los títulos virales y controlar la respuesta al tratamiento. Igualmente, se espera que tenga mayor sensibilidad y que reduzca en un 11% los resultados falsos negativos de las pruebas que detectan L1 con el fin de aumentar el grado de certeza y oportunidad en el diagnóstico de CCU; impactar positivamente sobre la disminución de la incidencia de casos y la tasa de mortalidad en Colombia; y permitir la optimización de los recursos del sistema de salud.

Referencias Bibliográficas

- Amaro-Filho, S. M., Gradissimo, A., Usyk, M., Moreira, F. C. B., de Almeida, L. M., Moreira, M. A. M., & Burk, R. D. (2020). HPV73 a nonvaccine type causes cervical cancer. *International Journal of Cancer*, *146*(3), 731–738. <https://doi.org/10.1002/ijc.32315>
- Anderson, B. O., Yip, C. H., Smith, R. A., Shyyan, R., Sener, S. F., Eniu, A., Carlson, R. W., Azavedo, E., & Harford, J. (2008). Guideline implementation for breast healthcare in low-income and middle-income countries: Overview of the breast health global initiative Global Summit 2007. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.23844>
- Andersson, S. (2012). High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA and L1 DNA as markers of residual/recurrent cervical intraepithelial neoplasia. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2012.1755>
- Arafa, M., Boniver, J., & Delvenne, P. (2008). Detection of Hpv-induced Cervical (pre) Neoplastic Lesions: A Tissue Microarray (tma) Study. *Applied Immunohistochemistry & 16*(5), 422–432. <https://doi.org/10.1097/pai.0b013e318166fd42>
- Banks, L., Edmonds, C., & Vousden, K. H. (1990). Ability of the HPV16 E7 protein to bind RB and induce DNA synthesis is not sufficient for efficient transforming activity in NIH3T3 cells - PubMed. *Oncogene*, *5*(9), 1383–1389. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2216461/>
- Baseman, J. G., & Koutsky, L. A. (2005). The epidemiology of human papillomavirus infections. *Journal of Clinical Virology*, *32*, 16–24. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.12.008>
- Beinhauerova, M., Babak, V., Bertasi, B., Boniotti, M. B., & Kralik, P. (2020). Utilization of

- Digital PCR in Quantity Verification of Plasmid Standards Used in Quantitative PCR. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 7, 155. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00155>
- Bernard, H. U., Burk, R. D., Chen, Z., van Doorslaer, K., Hausen, H. zur, & de Villiers, E. M. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>
- Bernard, H. U., Chan, S. Y., Manos, M. M., Ong, C. K., Villa, L., Delius, H., Peyton, C., Bauer, H., & Wheeler, C. (1994). Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *Journal of Infectious Diseases*, 170(5), 1077–1085. <https://doi.org/10.1093/infdis/170.5.1077>
- Bernard, P., Gabarit, P., Bahassi, E. M., & Couturier, M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene. *Gene*, 148(1), 71–74. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90235-6](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90235-6)
- Best, K., Oakes, T., Heather, J. M., Shawe-Taylor, J., & Chain, B. (2015). Computational analysis of stochastic heterogeneity in PCR amplification efficiency revealed by single molecule barcoding. *Scientific Reports*, 5(1), 14629. <https://doi.org/10.1038/srep14629>
- Bin, H., Ruifang, W., Ruizhen, L., Yiheng, L., Zhihong, L., Juan, L., Chun, W., Yanqiu, Z., & Leiming, W. (2013). Detention of HPV L1 Capsid Protein and hTERT Gene in Screening of Cervical Cancer. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(6), 797–802. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23997907>

- Bodelon, C., Vinokurova, S., Sampson, J. N., den Boon, J. A., Walker, J. L., Horswill, M. A., Korthauer, K., Schiffman, M., Sherman, M. E., Zuna, R. E., Mitchell, J., Zhang, X., Boland, J. F., Chaturvedi, A. K., Dunn, S. T., Newton, M. A., Ahlquist, P., Wang, S. S., & Wentzensen, N. (2016). Chromosomal copy number alterations and HPV integration in cervical precancer and invasive cancer. *Carcinogenesis*, *37*(2), 188–196. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgv171>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bruni, L., Diaz, M., Castellsagué, X., Ferrer, E., Bosch, F. X., & De Sanjosé, S. (2010). *Cervical Human Papillomavirus Prevalence in 5 Continents: Meta-Analysis of 1 Million Women with Normal Cytological Findings*. <https://doi.org/10.1086/657321>
- Buck, C. B., Day, P. M., & Trus, B. L. (2013). The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, *445*(1–2), 169–174. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2013.05.038>
- Bustin, S., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Bustin, S., & Huggett, J. (2017). qPCR primer design revisited. In *Biomolecular Detection and*

- Quantification* (Vol. 14, pp. 19–28). Elsevier GmbH.
<https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.11.001>
- Chen, A. A., Heideman, D. A. M., Boon, D., Gheit, T., Snijders, P. J. F., Tommasino, M., Franceschi, S., & Clifford, G. M. (2014). Human Papillomavirus 45 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide. *Journal of Virology*, 88(8), 4514–4521.
<https://doi.org/10.1128/jvi.03534-13>
- Chen, W., Li, F., Mead, L., White, H., Walker, J., Ingram, D. A., & Roman, A. (2007). Human papillomavirus causes an angiogenic switch in keratinocytes which is sufficient to alter endothelial cell behavior. *Virology*, 367(1), 168–174.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.030>
- Comar, M., Iannacone, M. R., Casalicchio, G., McKay-Chopin, S., Tommasino, M., & Gheit, T. (2012). Comparison of hybrid capture II, linear array, and a bead-based multiplex genotyping assay for detection of human papillomavirus in women with negative pap test results and atypical squamous cells of undetermined significance. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(12), 4041–4046. <https://doi.org/10.1128/JCM.02105-12>
- Costa, J. (2004). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. In *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. <https://doi.org/10.1157/13059826>
- Cuzick, J., Clavel, C., Petry, K.-U., Meijer, C. J. L. M., Hoyer, H., Ratnam, S., Szarewski, A., Birembaut, P., Kulasingam, S., Sasieni, P., & Iftner, T. (2006). Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *International Journal of Cancer*, 119(5), 1095–1101. <https://doi.org/10.1002/ijc.21955>

- Cuzick, J., Sasieni, P., Davies, P., Adams, J., Normand, C., Frater, A., van Ballegooijen, M., & van den Akker-van Marle, E. (2000). A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. *British Journal of Cancer*, 83(5), 561–565. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1375>
- Dalstein, V., Riethmuller, D., Préteti, J. L., Le Bail Carval, K., Sautière, J. L., Carbillet, J. P., Kantelip, B., Schaal, J. P., & Mouglin, C. (2003). Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: A longitudinal French cohort study. *International Journal of Cancer*, 106(3), 396–403. <https://doi.org/10.1002/ijc.11222>
- de Boer, M. A., Peters, L. A. W., Aziz, M. F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M. A., Jordanova, E. S., Kolkman-Uljee, S., & Fleuren, G. J. (2004). Human papillomavirus type 16 E6, E7, and L1 variants in cervical cancer in Indonesia, Suriname, and the Netherlands. *Gynecologic Oncology*, 94(2), 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.05.037>
- de Villiers, E. M. (1994). Human pathogenic papillomavirus types: An update. In *Current Topics in Microbiology and Immunology* (Vol. 186, pp. 1–12). Springer Verlag. https://doi.org/10.1007/978-3-642-78487-3_1
- Depuydt, C. E., Boulet, G. A. V., Horvath, C. A. J., Benoy, I. H., Vereecken, A. J., & Bogers, J. J. (2007). Comparison of MY09/11 consensus PCR and type-specific PCRs in the detection of oncogenic HPV types. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 11(4), 881–891. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2007.00073.x>
- Didenko, V. V. (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): Designs and applications. In *BioTechniques*.

- Dong, L., Meng, Y., Wang, J., & Liu, Y. (2014). Evaluation of droplet digital PCR for characterizing plasmid reference material used for quantifying ammonia oxidizers and denitrifiers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(6), 1701–1712. <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7546-1>
- Doorbar, J. (2006). Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science*, 110(5), 525–541. <https://doi.org/10.1042/CS20050369>
- Doorbar, J., Egawa, N., Griffin, H., Kranjec, C., & Murakami, I. (2015). Human papillomavirus molecular biology and disease association. *Reviews in Medical Virology*, 25, 2–23. <https://doi.org/10.1002/rmv.1822>
- Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, 30(Suppl 5), F55-70. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1002/ijc.25516>
- Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., Forman, D., & Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, 136(5), E359–E386. <https://doi.org/10.1002/ijc.29210>
- Franco, E. L. (2003). Chapter 13: Primary screening of cervical cancer with human papillomavirus

- tests. In *Journal of the National Cancer Institute. Monographs*.
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003488>
- Gamboa, O., Chicaíza, L., García-Molina, M., Díaz, J., González, M., Murillo, R., Ballesteros, M., & Sánchez, R. (2008). Cost-effectiveness of conventional cytology and HPV DNA testing for cervical cancer screening in Colombia. *Salud Publica de Mexico*.
<https://doi.org/10.1590/S0036-36342008000400005>
- García-López, T., León-Hernández, J., García-Perdomo, H., & Pacheco, R. (2017). Evaluación de un programa de detección temprana de cáncer cervicouterino en Colombia. *Revista Colombiana de Cancerología*. <https://doi.org/10.1016/j.rccan.2017.09.001>
- Gattoc, L., & Flowers, L. C. (2015). Colposcopy. In *Clinical Gynecology, Second Edition*.
<https://doi.org/10.1017/CBO9781139628938.015>
- Gebhart, C. (2014). Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice, 2 nd edition .
Laboratory Medicine, 45(1), e8–e8. <https://doi.org/10.1309/lmbw4ekpg1tmctyo>
- Goodwin, E. C., Yang, E., Lee, C. J., Lee, H. W., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2000). Rapid induction of senescence in human cervical carcinoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.20.10978>
- Hao, M., Wang, X. L., Bian, M. L., & Liu, H. T. (2010). Human papillomavirus type 16 intratypic variant infection and risk for cervical neoplasia. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi = Zhonghua Shiyan He Linchuang Bingduxue Zazhi = Chinese Journal of*

- Experimental and Clinical Virology*, 24(1), 24–26. <https://doi.org/10.1086/342048>
- He, J., Li, Q., Peng, J., Ma, S., Song, Z., Liu, Y., Cui, Y., Deng, J., & Wei, X. (2021). *Human papillomavirus type 68 prevalence and genetic variability based on E6/E7 genes in Sichuan*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-310542/v1>
- Hellner, K., Mar, J., Fang, F., Quackenbush, J., & Münger, K. (2009). HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. *Virology*, 391(1), 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.036>
- Hindson, B. J., Ness, K. D., Masquelier, D. A., Belgrader, P., Heredia, N. J., Makarewicz, A. J., Bright, I. J., Lucero, M. Y., Hiddessen, A. L., Legler, T. C., Kitano, T. K., Hodel, M. R., Petersen, J. F., Wyatt, P. W., Steenblock, E. R., Shah, P. H., Bousse, L. J., Troup, C. B., Mellen, J. C., ... Colston, B. W. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *Analytical Chemistry*, 83(22), 8604–8610. <https://doi.org/10.1021/ac202028g>
- Hirose, Y., Onuki, M., Tenjimbayashi, Y., Mori, S., Ishii, Y., Takeuchi, T., Tasaka, N., Satoh, T., Morisada, T., Iwata, T., Miyamoto, S., Matsumoto, K., Sekizawa, A., & Kukimoto, I. (2018). Within-Host Variations of Human Papillomavirus Reveal APOBEC Signature Mutagenesis in the Viral Genome. *Journal of Virology*, 92(12), e00017-18. <https://doi.org/10.1128/jvi.00017-18>
- Hou, Y., Zhang, H., Miranda, L., & Lin, S. (2010). Serious overestimation in quantitative pcr by circular (supercoiled) plasmid standard: Microalgal pcnaas the model gene. *PLoS ONE*,

- 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009545>
- IARC. (2018). *Age standardized (World) mortality rates, cervix uteri, all ages*. <http://gco.iarc.fr/today>
- Instituto Nacional de Cancerología. (2007). *Recomendaciones para la tamización de neoplasias del cuello uterino en mujeres sin antecedentes de patología cervical (preinvasora o invasora) en Colombia*. <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=668558&indexSearch=ID>
- Jing, Y., Wang, T., Chen, Z., Ding, X., Xu, J., Mu, X., Cao, M., & Chen, H. (2018). Phylogeny and polymorphism in the long control regions E6, E7, and L1 of HPV Type 56 in women from southwest China. *Molecular Medicine Reports*, 17(5), 7131–7141. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8743>
- Josefsson, A. M., Magnusson, P. K. E., Ylitalo, N., Sørensen, P., Qwarforth-Tubbin, P., Kragh Andersen, P., Melbye, M., Adami, H. O., & Gyllensten, U. B. (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinant for development of cervical carcinoma in situ: A nested case-control study. *Lancet*, 355(9222), 2189–2193. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)02401-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)02401-6)
- Kline, M. C., Duewer, D. L., Travis, J. C., Smith, M. V., Redman, J. W., Vallone, P. M., Decker, A. E., & Butler, J. M. (2009). Production and certification of NIST Standard Reference Material 2372 Human DNA Quantitation Standard. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394(4), 1183–1192. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-2782-0>

- Koliopoulos, G., Nyaga, V. N., Santesso, N., Bryant, A., Martin-Hirsch, P. P., Mustafa, R. A., Schünemann, H., Paraskevaidis, E., & Arbyn, M. (2017). Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 8. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008587.pub2>
- Li, N., Franceschi, S., Howell-Jones, R., Snijders, P. J. F., & Clifford, G. M. (2011). Human papillomavirus type distribution in 30,848 invasive cervical cancers worldwide: Variation by geographical region, histological type and year of publication. *International Journal of Cancer*, 128(4), 927–935. <https://doi.org/10.1002/ijc.25396>
- Lin, C. H., Chen, Y. C., & Pan, T. M. (2011). Quantification bias caused by plasmid DNA conformation in quantitative real-time PCR assay. *PLoS ONE*, 6(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029101>
- Liu, Y., Lu, Z., Xu, R., & Ke, Y. (2016). Comprehensive mapping of the human papillomavirus (HPV) DNA integration sites in cervical carcinomas by HPV capture technology. *Oncotarget*, 7(5), 5852–5864. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6809>
- Lorincz, A. T., Castle, P. E., Sherman, M. E., Scott, D. R., Glass, A. G., Wacholder, S., Rush, B. B., Gravitt, P. E., Schussler, J. E., & Schiffman, M. (2002). Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. *Lancet*, 360(9328), 228–229. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(02\)09463-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)09463-1)
- McBride, A. A., & Warburton, A. (2017). The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathogens*, 13(4), e1006211. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006211>

- McGuire, S. (2016). World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015. *Advances in Nutrition*, 7(2), 418–419. <https://doi.org/10.3945/an.116.012211>
- McLaughlin-Drubin, M. E., Meyers, J., & Munger, K. (2012). Cancer associated human papillomaviruses. *Current Opinion in Virology*, 2(4), 459–466. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.05.004>
- McLaughlin-Drubin, M. E., & Münger, K. (2009). The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology*, 384(2), 335–344. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.10.006>
- Melsheimer, P., Vinokurova, S., Wentzensen, N., Bastert, G., & von Knebel Doeberitz, M. (2004). DNA aneuploidy and integration of human papillomavirus type 16 e6/e7 oncogenes in intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(9), 3059–3063. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131043>
- Mesri, E. A., Feitelson, M. A., & Munger, K. (2014). Human Viral Oncogenesis: A Cancer Hallmarks Analysis. *Cell Host & Microbe*, 15(3), 266–282. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.02.011>
- Ministerio de Salud y Protección Social. (n.d.). *Cáncer de cuello uterino*. Retrieved July 11, 2019, from www.minsalud.gov.co/salud/publica/ssr/Paginas/Cancer-de-cuello-uterino.aspx
- Ministerio de Salud y Protección Social. (2012). *Lineamientos técnicos y operativos para la vacunación contra el Virus del Papiloma Humano (VPH)*.

https://www.minsalud.gov.co/salud/Documents/Lineamientos_VPH.pdf

- Mirabello, L., Yeager, M., Yu, K., Porras, C., Burk, R. D., Schiffman Correspondence, M., Mirabello, L., Clifford, G. M., Xiao, Y., Zhu, B., Cullen, M., Boland, J. F., Wentzensen, N., Nelson, C. W., Raine-Bennett, T., Chen, Z., Bass, S., Song, L., Yang, Q., ... Schiffman, M. (2017). HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis In Brief Article HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis. *Cell*, 170. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.001>
- Moody, C. A., & Laimins, L. A. (2010). Human papillomavirus oncoproteins: Pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), 550–560. <https://doi.org/10.1038/nrc2886>
- Muñoz, N., Bosch, F. X., De Sanjosé, S., Herrero, R., Castellsagué, X., Shah, K. V., Snijders, P. J. F., & Meijer, C. J. L. M. (2003). Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *New England Journal of Medicine*. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa021641>
- Muñoz, N., Castellsagué, X., de González, A. B., & Gissmann, L. (2006). Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2006.05.115>
- Murillo, R., Wiesner, C., Cendales, R., Piñeros, M., & Tovar, S. (2011). Comprehensive evaluation of cervical cancer screening programs: The case of Colombia. *Salud Publica de Mexico*.
- Navarro, E., Serrano-Heras, G., Castaño, M. J., & Solera, J. (2015). Real-time PCR detection chemistry. In *Clinica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.10.017>
- Nedelman, J., Heagerty, P., & Lawrence, C. (1992). Quantitative PCR with internal controls.

- Bioinformatics*, 8(1), 65–70. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.1.65>
- Oldham, A. L., & Duncan, K. E. (2012). Similar Gene Estimates from Circular and Linear Standards in Quantitative PCR Analyses Using the Prokaryotic 16S rRNA Gene as a Model. *PLoS ONE*, 7(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051931>
- ÖStör, A. G. (1993). Natural history of cervical intraepithelial Neoplasia: A critical review. In *International Journal of Gynecological Pathology*. <https://doi.org/10.1097/00004347-199304000-00018>
- Paes, E. F., de Assis, A. M., Teixeira, C. S. C., Aoki, F. H., & Teixeira, J. C. (2015). Development of a Multiplex PCR Test with Automated Genotyping Targeting E7 for Detection of Six High-Risk Human Papillomaviruses. *PLOS ONE*, 10(6), e0130226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130226>
- Pande, S., Jain, N., Prusty, B. K., Bhambhani, S., Gupta, S., Sharma, R., Batra, S., & Das, B. C. (2008). Human papillomavirus type 16 variant analysis of E6, E7, and L1 genes and long control region in biopsy samples from cervical cancer patients in North India. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(3), 1060–1066. <https://doi.org/10.1128/JCM.02202-07>
- Peña-López, B. O., Torrado G, L. M., Martínez-Vega, R. A., & Rincon-Orozco, B. (2018). Desarrollo de un prototipo de PCR Multiplex de primera generación para detección del oncogén E7 de VPHs de alto riesgo. *II Encuentro Internacional En Ciencias de La Salud*.
- Petry, K. U., Cox, J. T., Johnson, K., Quint, W., Ridder, R., Sideri, M., Wright, T. C., & Behrens, C. M. (2016). Evaluating HPV-negative CIN2+ in the ATHENA trial. *International*

- Journal of Cancer*, 138(12), 2932–2939. <https://doi.org/10.1002/ijc.30032>
- Petry, K. U., Liebrich, C., Luyten, A., Zander, M., & Iftner, T. (2017). Surgical staging identified false HPV-negative cases in a large series of invasive cervical cancers. *Papillomavirus Research*, 4, 85–89. <https://doi.org/10.1016/j.pvr.2017.10.003>
- Pett, M., & Coleman, N. (2007). Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis? *The Journal of Pathology*, 212(4), 356–367. <https://doi.org/10.1002/path.2192>
- Poljak, M., Kocjan, B. J., Oštrbenk, A., & Seme, K. (2016). Commercially available molecular tests for human papillomaviruses (HPV): 2015 update. In *Journal of Clinical Virology* (Vol. 76, pp. S3–S13). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.10.023>
- qPCR Technical Guide*. (2008).
- Rincón, D. F., Morales L, L. A., & Rincón-Orozco, B. (2017). Modernas metodologías diagnosticas para la detección del Virus del Papiloma Humano y prevención del cáncer de cuello uterino. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, 49(3), 478–488. <https://doi.org/10.18273/revsal.v49n3-2017006>
- Rincón Martínez, L. M., & García Peralta, D. M. (2012). Las pruebas de ADN para el Virus Papiloma Humano -VPH. *Hechos y Acciones*, 4–1. https://www.cancer.gov.co/files/libros/archivos/354cd559443a595ea80d9dd1b968974e_Hechos_y_Acciones_VIA_VILI.pdf
- Roberts, C. C., Tadesse, A. S., Sands, J., Halvorsen, T., Schofield, T. L., Dalen, A., Skjeldestad,

- F. E., & Jansen, K. U. (2006). Detection of HPV in Norwegian cervical biopsy specimens with type-specific PCR and reverse line blot assays. *Journal of Clinical Virology*, *36*(4), 277–282. <https://doi.org/10.1016/J.JCV.2006.03.013>
- Roman, A., & Munger, K. (2013). The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, *445*(0), 138–168. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.04.013>
- Rovinskiy, N. S., Agbleke, A. A., Chesnokova, O. N., & Patrick Higgins, N. (2019). Supercoil levels in e. Coli and salmonella chromosomes are regulated by the c-terminal 35–38 amino acids of gyra. *Microorganisms*, *7*(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7030081>
- Saban, C., Christine, M., Barbara, K., & Philip, R. (1996). Analytic sensitivities of hybrid-capture, consensus and type-specific polymerase chain reactions for the detection of human papillomavirus type 16 DNA - PubMed. *J Med Virol*, *49*(4), 314–324. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8877765/>
- Şahiner, F., Kubar, A., Gümral, R., Ardiç, M., Yiğit, N., Şener, K., Dede, M., & Yapar, M. (2014). Efficiency of MY09/11 consensus PCR in the detection of multiple HPV infections. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *80*(1), 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.03.030>
- Sanders, R., Huggett, J. F., Bushell, C. A., Cowen, S., Scott, D. J., & Foy, C. A. (2011). Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Analytical Chemistry*, *83*(17), 6474–6484. <https://doi.org/10.1021/ac103230c>
- Sathish, N., Abraham, P., Peedicayil, A., Sridharan, G., & Chandy, G. (2005). HPV 16 E6

- sequence variations in Indian patients with cervical neoplasia. *Cancer Letters*, 229(1), 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.026>
- Schiffman, M., Rodriguez, A. C., Chen, Z., Wacholder, S., Herrero, R., Hildesheim, A., Desalle, R., Befano, B., Yu, K., Safaeian, M., Sherman, M. E., Morales, J., Guillen, D., Alfaro, M., Hutchinson, M., Solomon, D., Castle, P. E., & Burk, R. D. (2010). A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. *Cancer Research*, 70(8), 3159–3169. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4179>
- Schmitt, M., Dondog, B., Waterboer, T., Pawlita, M., Tommasino, M., & Gheit, T. (2010). Abundance of multiple high-risk human papillomavirus (HPV) infections found in cervical cells analyzed by use of an ultrasensitive HPV genotyping assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1), 143–149. <https://doi.org/10.1128/JCM.00991-09>
- Sistema General de Seguridad Social en Salud - Colombia. (2014). *Guía de Práctica Clínica para la detección y manejo de lesiones precancerosas de cuello uterino*. (Guía No. GPC 2014 – 44). <https://www.cancer.gov.co/Guías-y-Protocolos/Guías-de-Practica-clinica/LPC-Guia-profesionales.pdf>
- Smith, C. J., Nedwell, D. B., Dong, L. F., & Osborn, A. M. (2006). Evaluation of quantitative polymerase chain reaction-based approaches for determining gene copy and gene transcript numbers in environmental samples. *Environmental Microbiology*, 8(5), 804–815. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00963.x>
- Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S., Menton, M.,

- Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R., & Bültmann, B. (2004). Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(7), 3176–3184. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3176-3184.2004>
- Stanley, M. (2010). Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecologic Oncology*, 117(2 Suppl), S5-10. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.01.024>
- Stewart, A.-C. M., Eriksson, A. M., Manos, M. M., Muñoz, N., Muñoz, M., Bosch, F. X., Peto, J., & Wheeler, C. M. (1996). Intratype Variation in 12 Human Papillomavirus Types: a Worldwide Perspective. In *JOURNAL OF VIROLOGY* (Vol. 70, Issue 5).
- Stoler, M. H., Rhodes, C. R., Whitbeck, A., Wolinsky, S. M., Chow, L. T., & Broker, T. R. (1992). Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Human Pathology*, 23(2), 117–128. [https://doi.org/10.1016/0046-8177\(92\)90232-R](https://doi.org/10.1016/0046-8177(92)90232-R)
- Sunthamala, N., Thierry, F., Teissier, S., Pientong, C., Kongyingyoes, B., Tangsiriwatthana, T., Sangkomkamhang, U., & Ekalaksananan, T. (2014). E2 Proteins of High Risk Human Papillomaviruses Down-Modulate STING and IFN- κ Transcription in Keratinocytes. *PLoS ONE*, 9(3), e91473. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091473>
- Svec, D., Tichopad, A., Novosadova, V., Pfaffl, M. W., & Kubista, M. (2015). How good is a PCR efficiency estimate: Recommendations for precise and robust qPCR efficiency assessments. *Biomolecular Detection and Quantification*, 3, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2015.01.005>
- Swan, D. C., Tucker, R. A., Tortolero-Luna, G., Mitchell, M. F., Wideroff, L., Unger, E. R.,

- Nisenbaum, R. A., Reeves, W. C., & Icenogle, J. P. (1999). Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. *Journal of Clinical Microbiology*, *37*(4), 1030–1034. doi.org/10.1128/jcm.37.4.1030-1034.1999
- Terry, G., Ho, L., Londesborough, P., Cuzick, J., Mielzynska-Lohnas, I., & Lorincz, A. (2001). Detection of high-risk HPV types by the hybrid capture 2 test. *Journal of Medical Virology*, *65*(1), 155–162. https://doi.org/10.1002/jmv.2015
- Tjalma, W. A. A., & Depuydt, C. E. (2013). Cervical cancer screening: Which HPV test should be used - L1 or E6/E7? *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, *170*(1), 45–46. https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.06.027
- Torrado, L. M., Rincón Orozco, B., & Martínez-Vega, R. A. (2018). Genotipificación del Virus de Papiloma Humano en mujeres de la comuna norte de Bucaramanga. *Revista de La Universidad Industrial de Santander. Salud*, *50*(3), 225–232. https://doi.org/10.18273/revsal.v50n3-2018007
- Veldhuijzen, N. J., Snijders, P. J. F., Reiss, P., Meijer, C. J. L. M., & van de Wijkert, J. H. H. M. (2010). Factors affecting transmission of mucosal human papillomavirus. In *The Lancet Infectious Diseases*. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70190-0
- Vousden, K. (1993). Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *The FASEB Journal*, *7*(10), 872–879. https://doi.org/10.1096/fasebj.7.10.8393818
- Westrich, J. A., Warren, C. J., & Pyeon, D. (2017). Evasion of host immune defenses by human

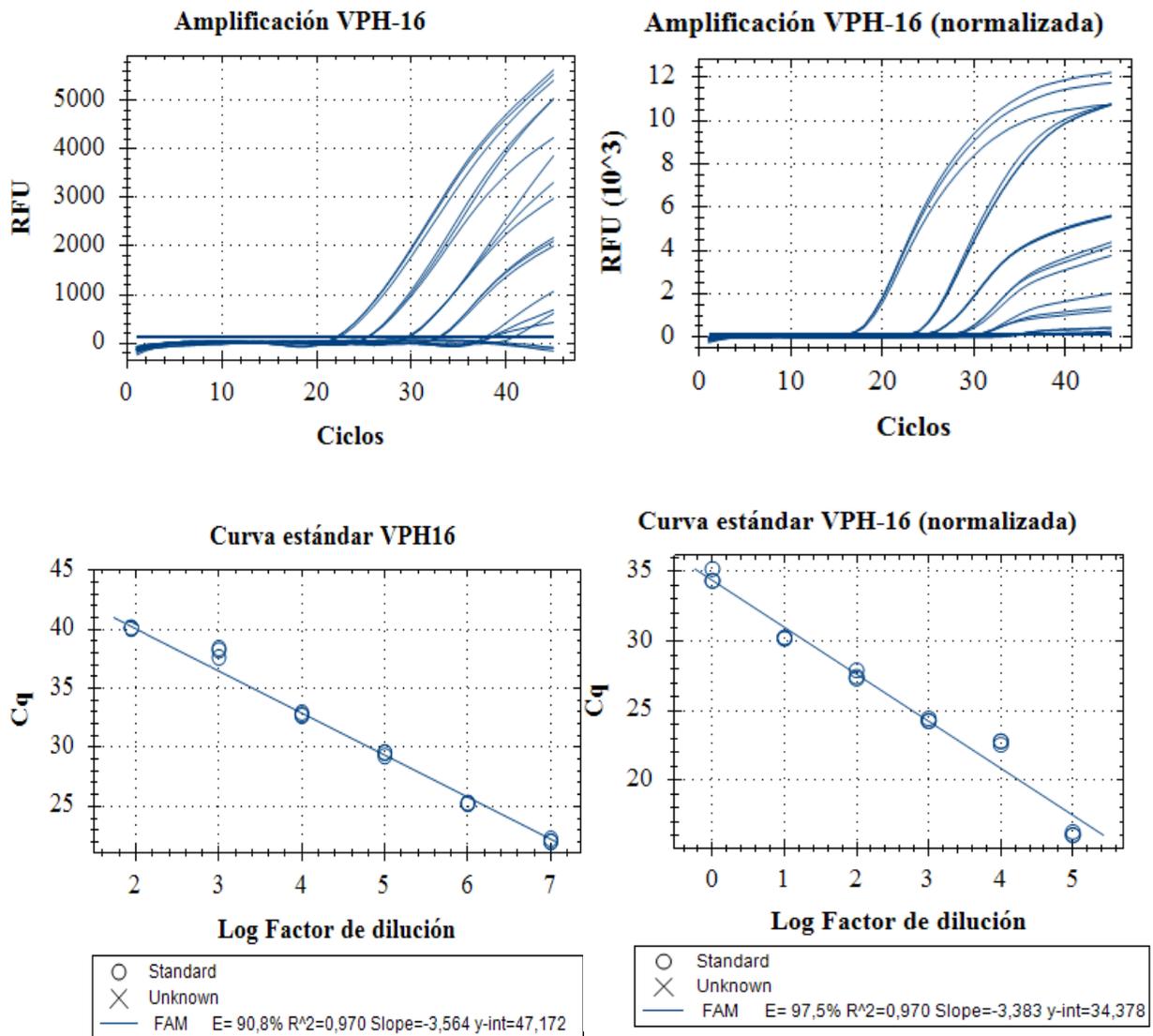
- papillomavirus. In *Virus Research* (Vol. 231, pp. 21–33). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2016.11.023>
- Wheeler, C. M., Yamada, T., Hildesheim, A., & Jenison, S. A. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(1).
- Whelan, J. A., Russell, N. B., & Whelan, M. A. (2003). A method for the absolute quantification of cDNA using real-time PCR. *Journal of Immunological Methods*. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(03\)00223-0](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(03)00223-0)
- Woodman, C. B. J., Collins, S. I., & Young, L. S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: Unresolved issues. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 7, Issue 1, pp. 11–22). Nat Rev Cancer. <https://doi.org/10.1038/nrc2050>
- Wu, Y., Chen, Y., Li, L., Yu, G., He, Y., & Zhang, Y. (2006). Analysis of mutations in the E6/E7 oncogenes and L1 gene of human papillomavirus 16 cervical cancer isolates from China. *Journal of General Virology*, 87(5), 1181–1188. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81649-0>
- Yamada, T., Wheeler, C. M., Manos, M. M., Peto, J., Greer, C. E., Muñoz, N., & Bosch, F. X. (1997). Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: A worldwide perspective. *Journal of Virology*.
- Yu, T., Ferber, M. J., Cheung, T. H., Chung, T. K. H., Wong, Y. F., & Smith, D. I. (2005). The role of viral integration in the development of cervical cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 158(1), 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2004.08.021>

- Zehbe, I., Voglino, G., Delius, H., Wilander, E., & Tommasino, M. (1998). Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet*, *352*(9138), 1441–1442. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)61263-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)61263-9)
- Zhao, J., Zhan, Q., Guo, J., Liu, M., Ruan, Y., Zhu, T., Han, L., & Li, F. (2019). Phylogeny and polymorphism in the E6 and E7 of human papillomavirus: Alpha-9 (HPV16, 31, 33, 52, 58), alpha-5 (HPV51), alpha-6 (HPV53, 66), alpha-7 (HPV18, 39, 59, 68) and alpha-10 (HPV6, 44) in women from Shanghai. *Infectious Agents and Cancer*, *14*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0250-9>
- Zhe, X., Xin, H., Pain, Z., Jin, F., Zheng, W., Li, H., Li, D., Cao, D., Li, Y., Zhang, C., Fu, S., Shao, R., & Pan, Z. (2019). Genetic variations in E6, E7 and the long control region of human papillomavirus type 16 among patients with cervical lesions in Xinjiang, China. *Cancer Cell International*, *19*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0774-5>
- zur Hausen, H. (1989). Host cell regulation of HPV transforming gene expression. In *Princess Takamatsu symposia*.
- zur Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, *384*(2), 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>
- Zwerschke, W., Mazurek, S., Massimi, P., Banks, L., Eigenbrodt, E., & Jansen-Dürr, P. (1999). Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(4), 1291–1296.

Apéndices

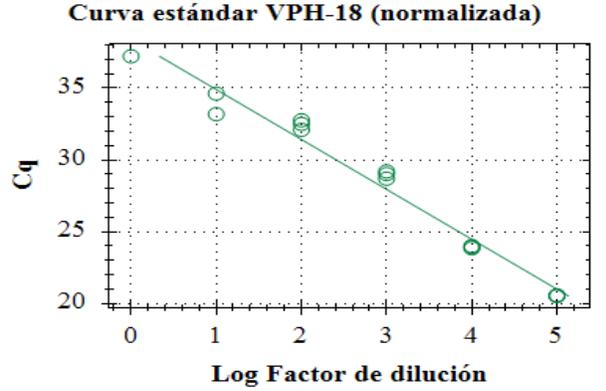
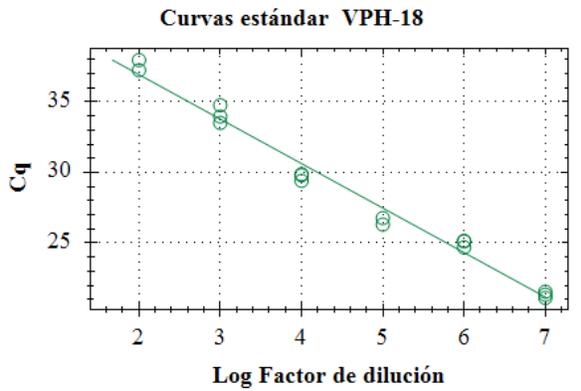
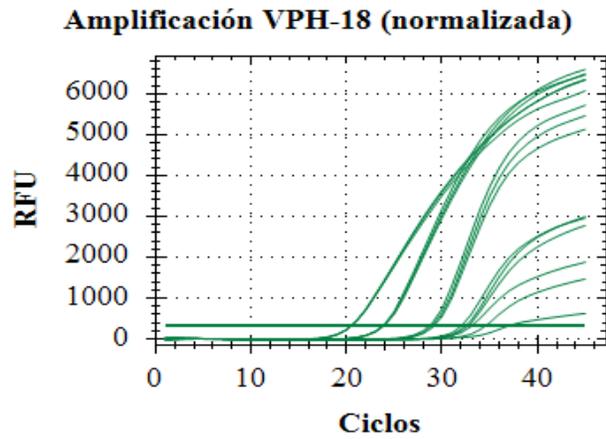
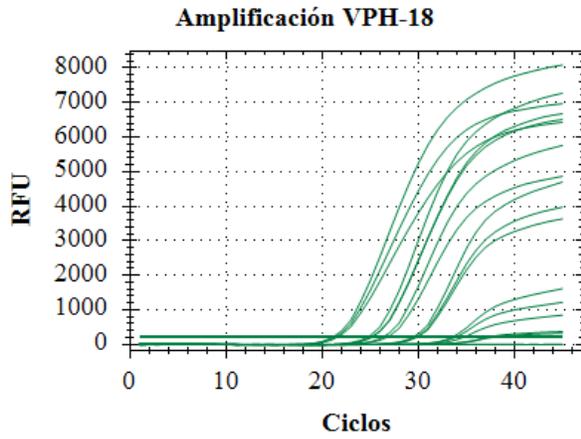
Apéndice A.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-16 a partir de la primera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



Apéndice B.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-18 a partir de la primera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR

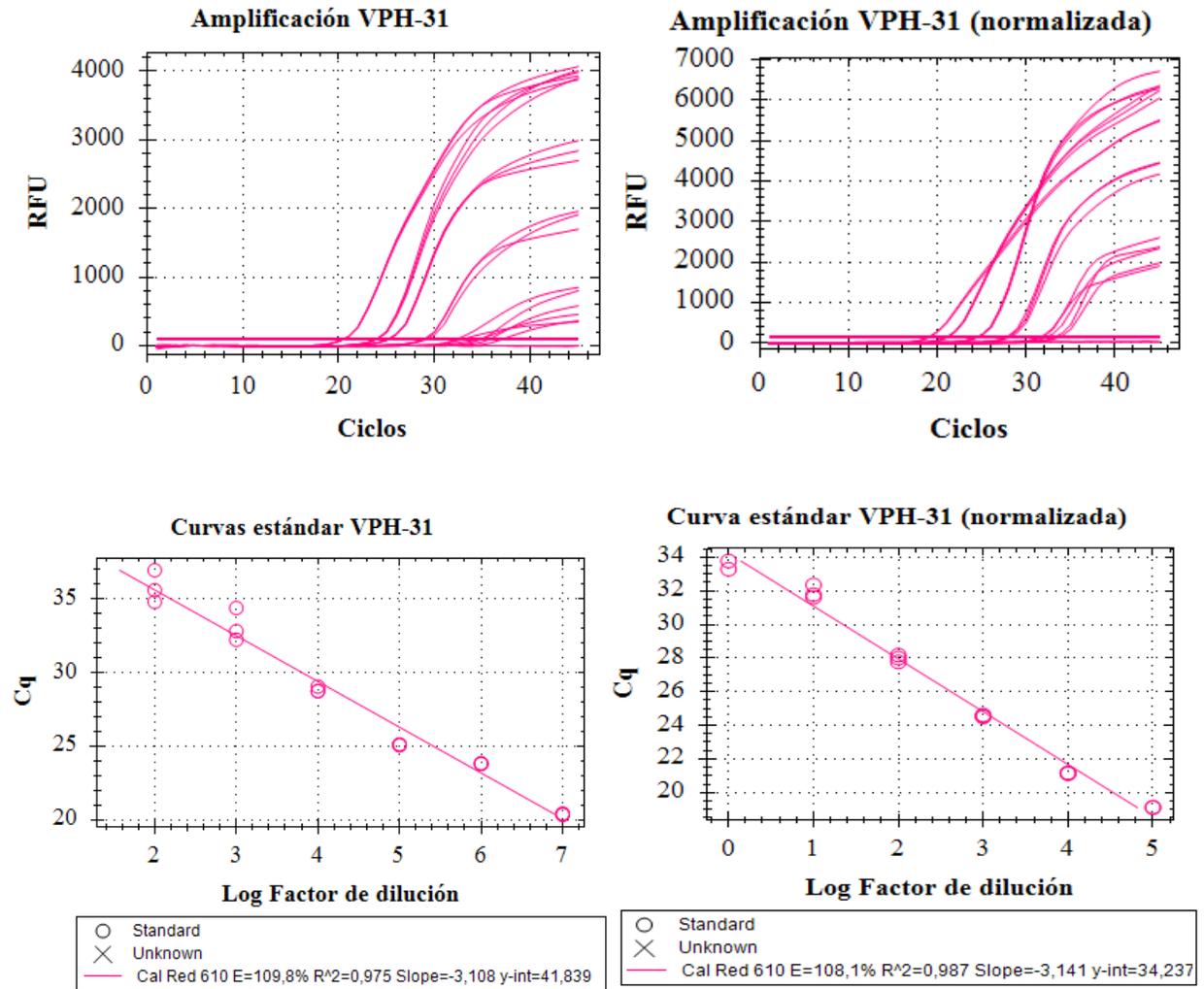


○ Standard
 × Unknown
 — Cal Gold 540 E=107,7% R²=0,982 Slope=-3,151 y-int=43,238

○ Standard
 × Unknown
 — Cal Gold 540 E= 94,0% R²=0,971 Slope=-3,476 y-int=38,382

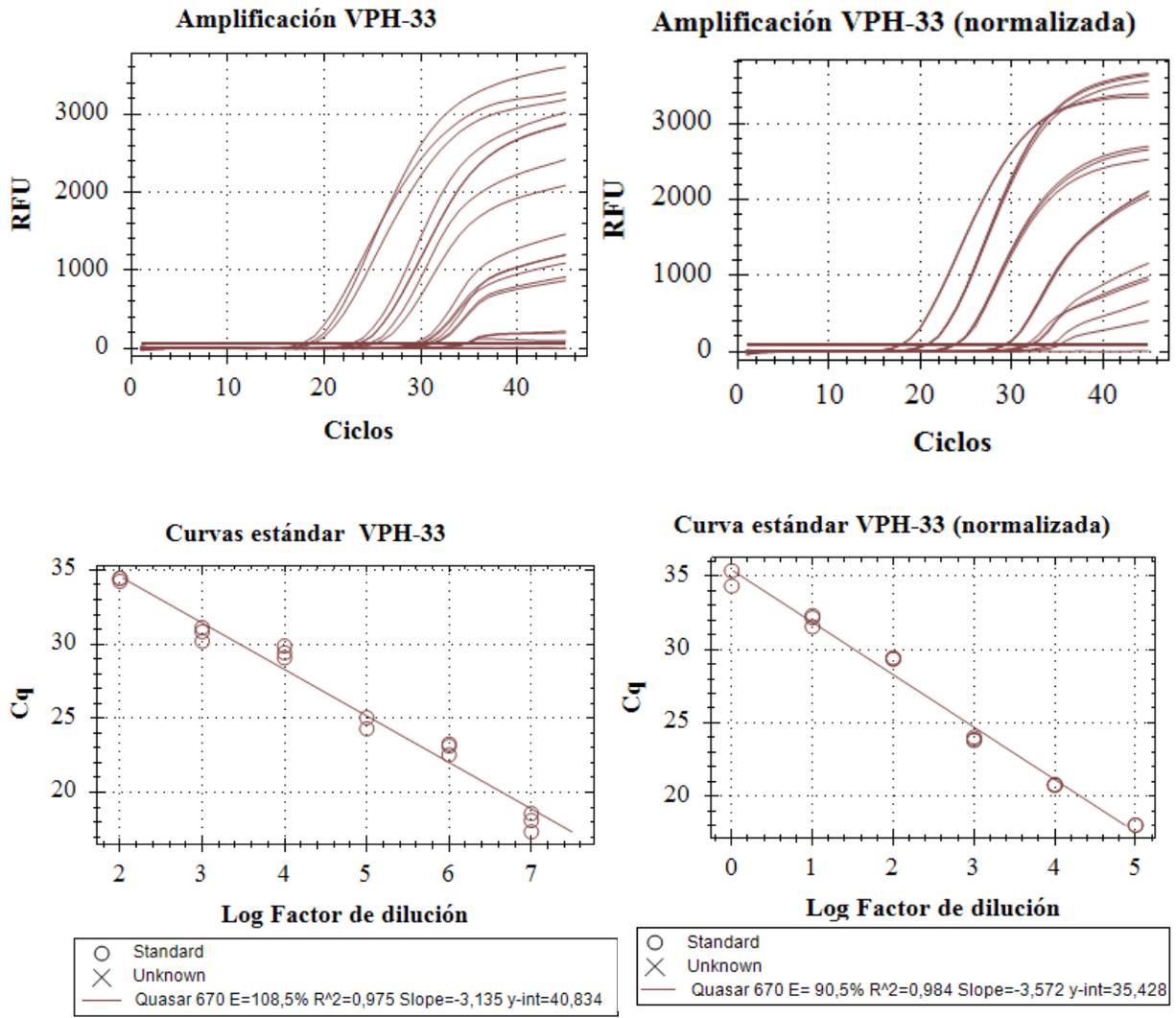
Apéndice C.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-31 a partir de la primera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



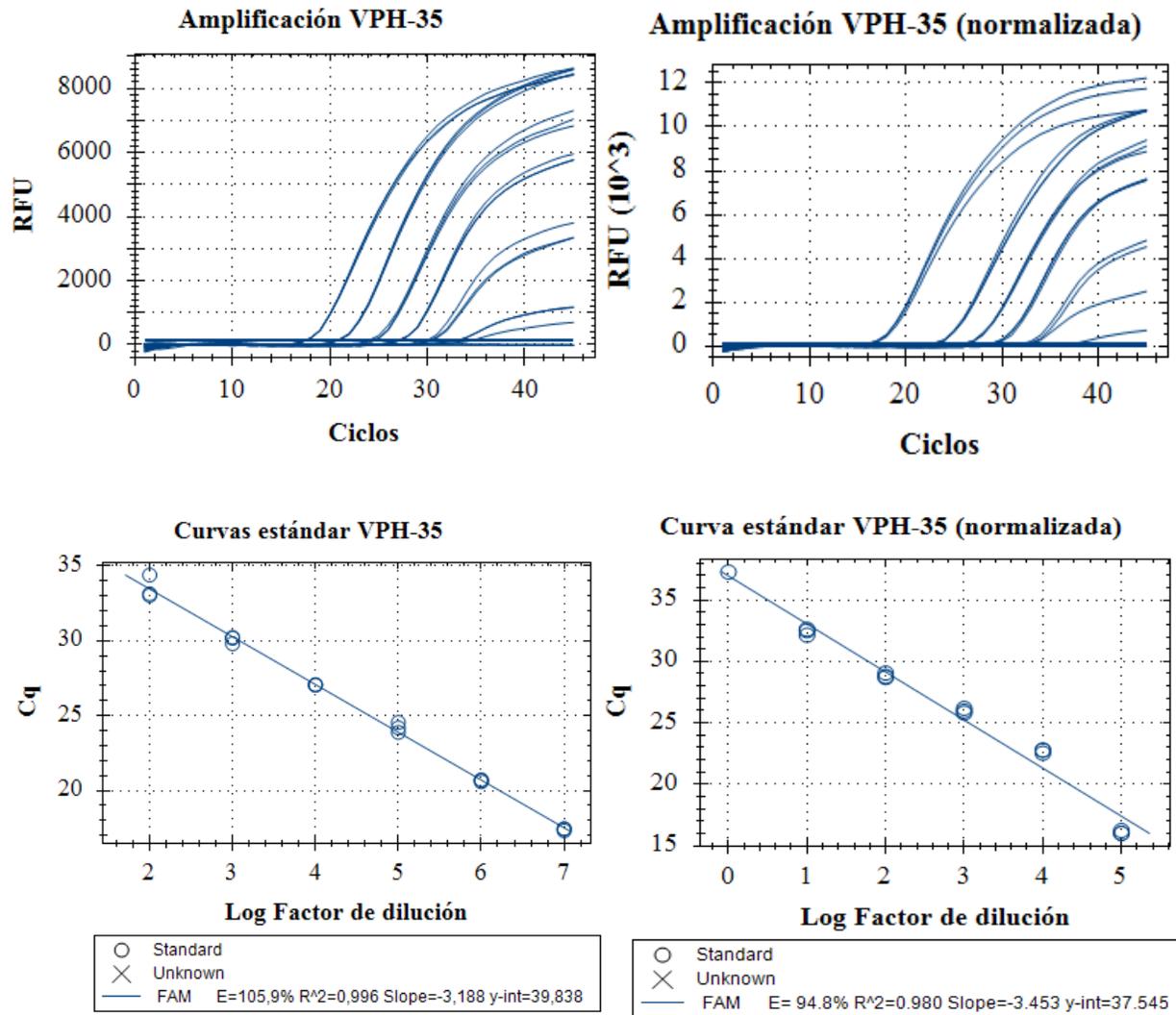
Apéndice D.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-33 a partir de la primera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



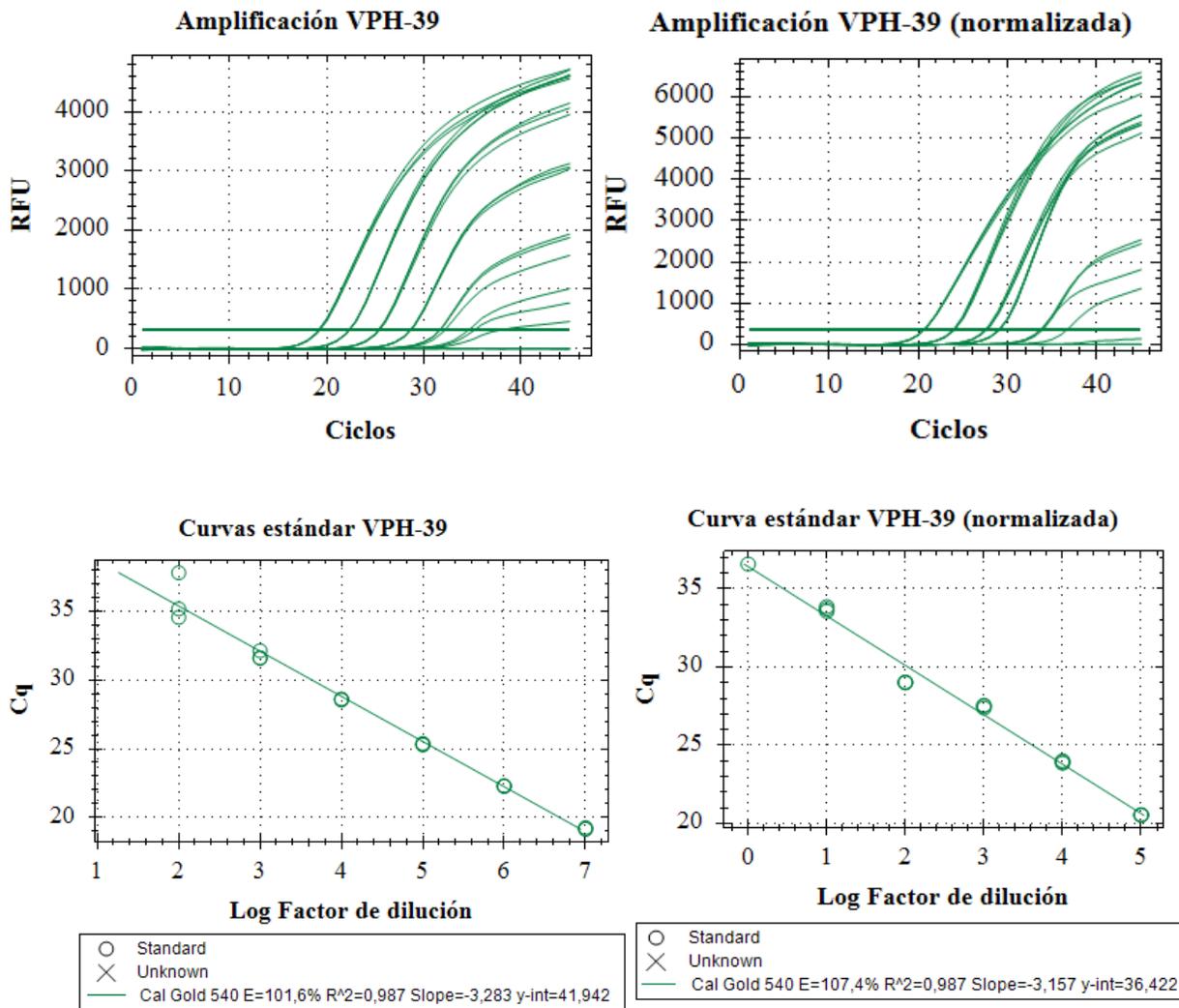
Apéndice E.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-35 a partir de la segunda multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



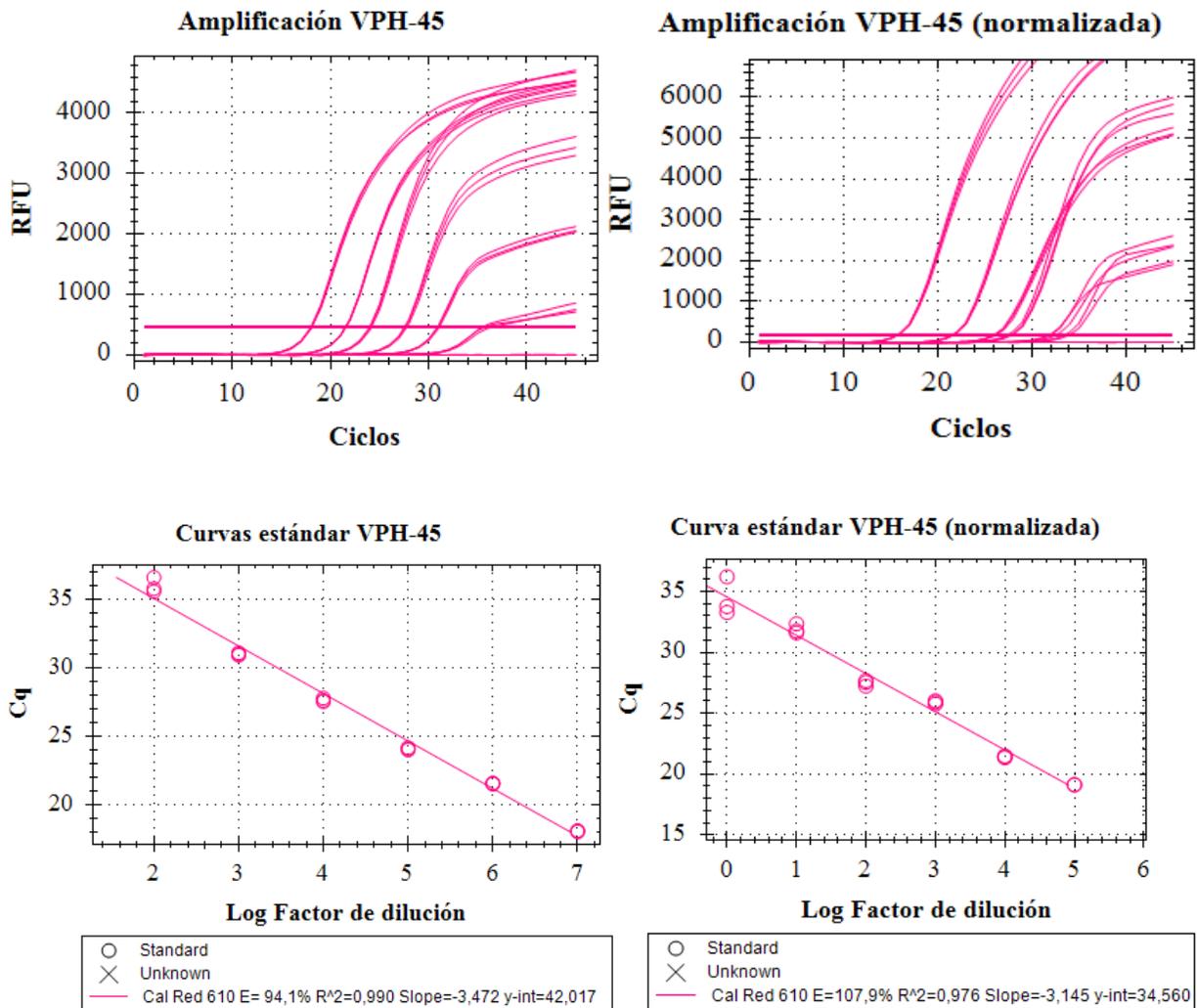
Apéndice F.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-39 a partir de la segunda multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



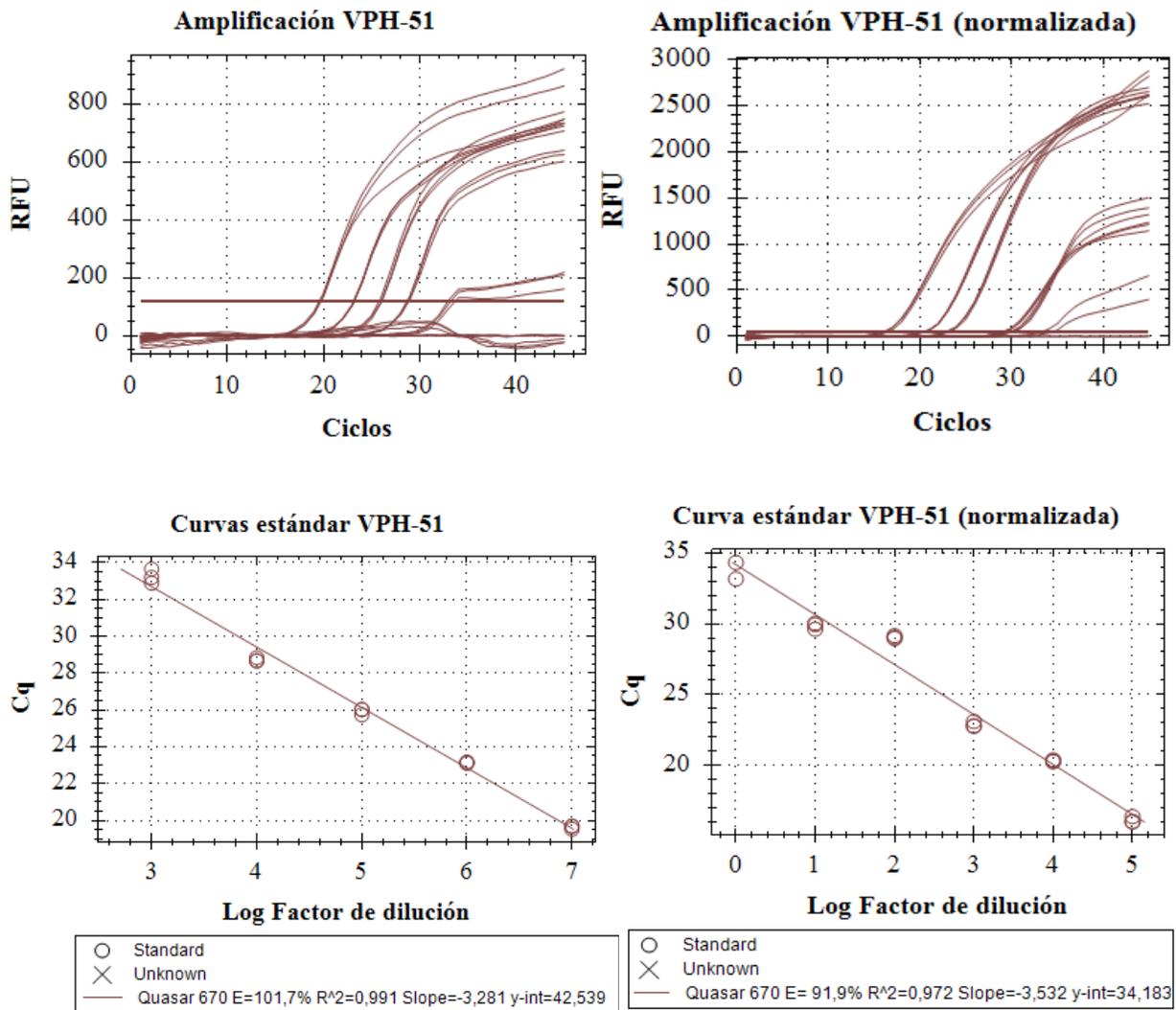
Apéndice G.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-45 a partir de la segunda multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



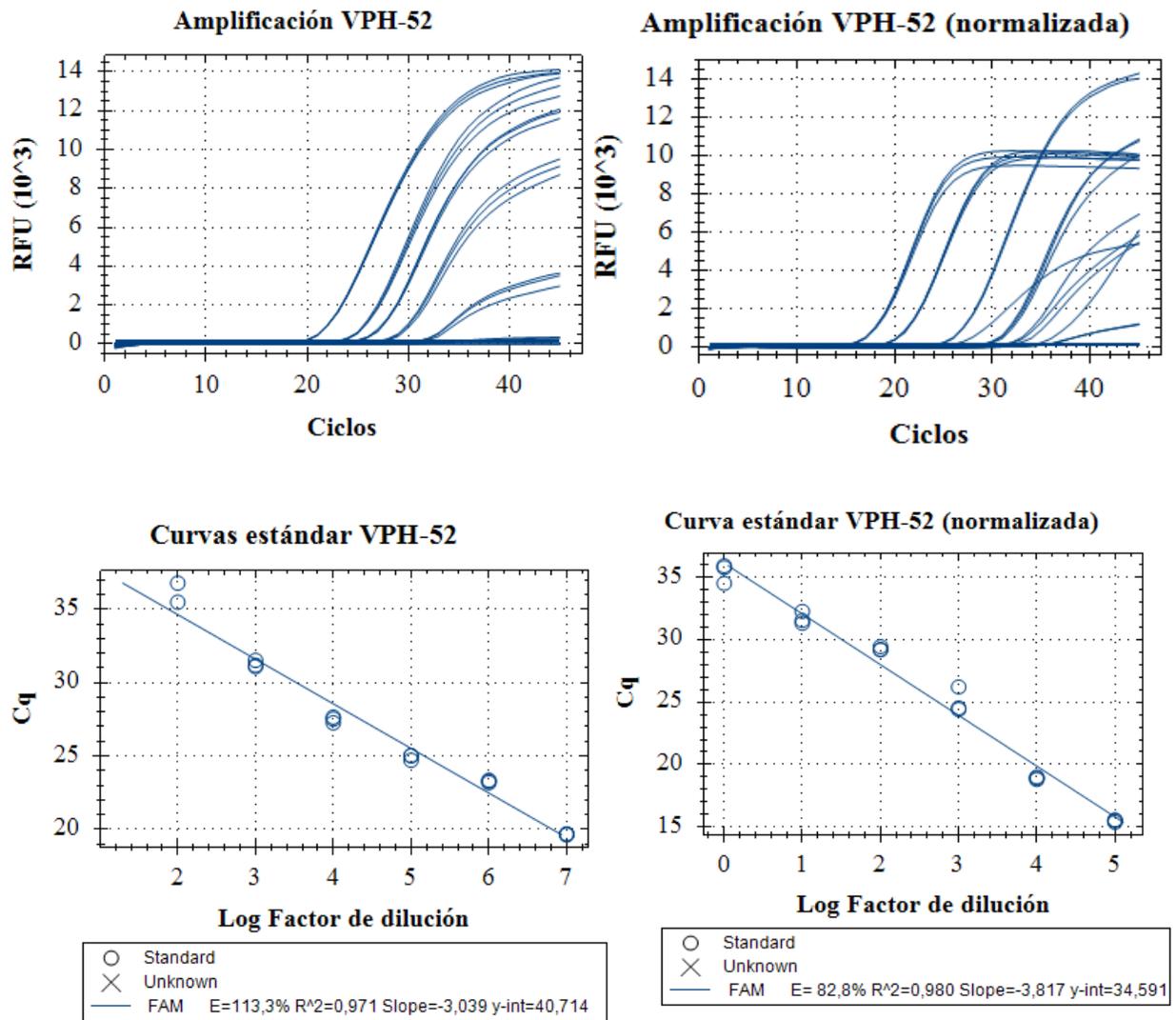
Apéndice H.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-51 a partir de la segunda multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



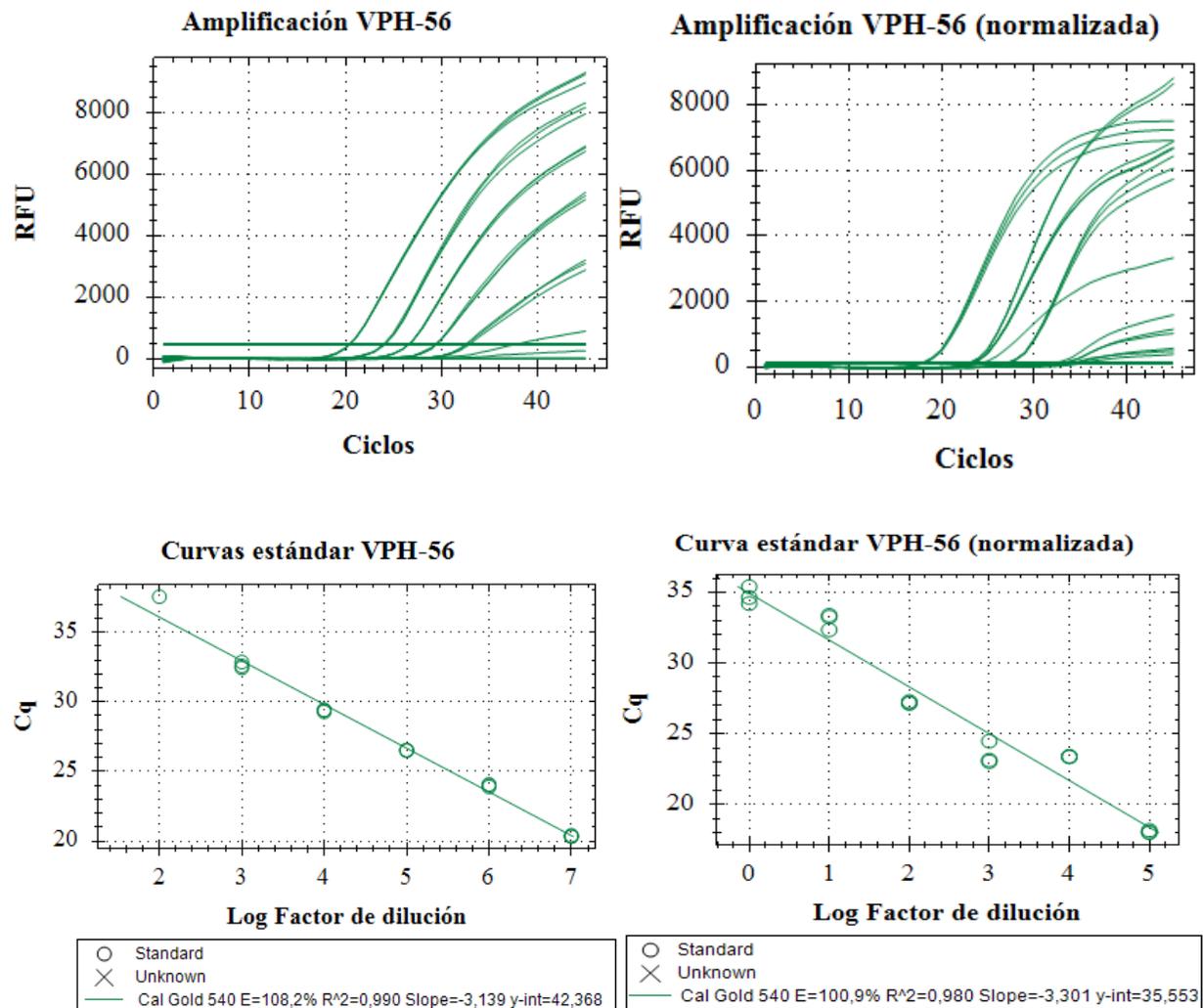
Apéndice I.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-52 a partir de la tercera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



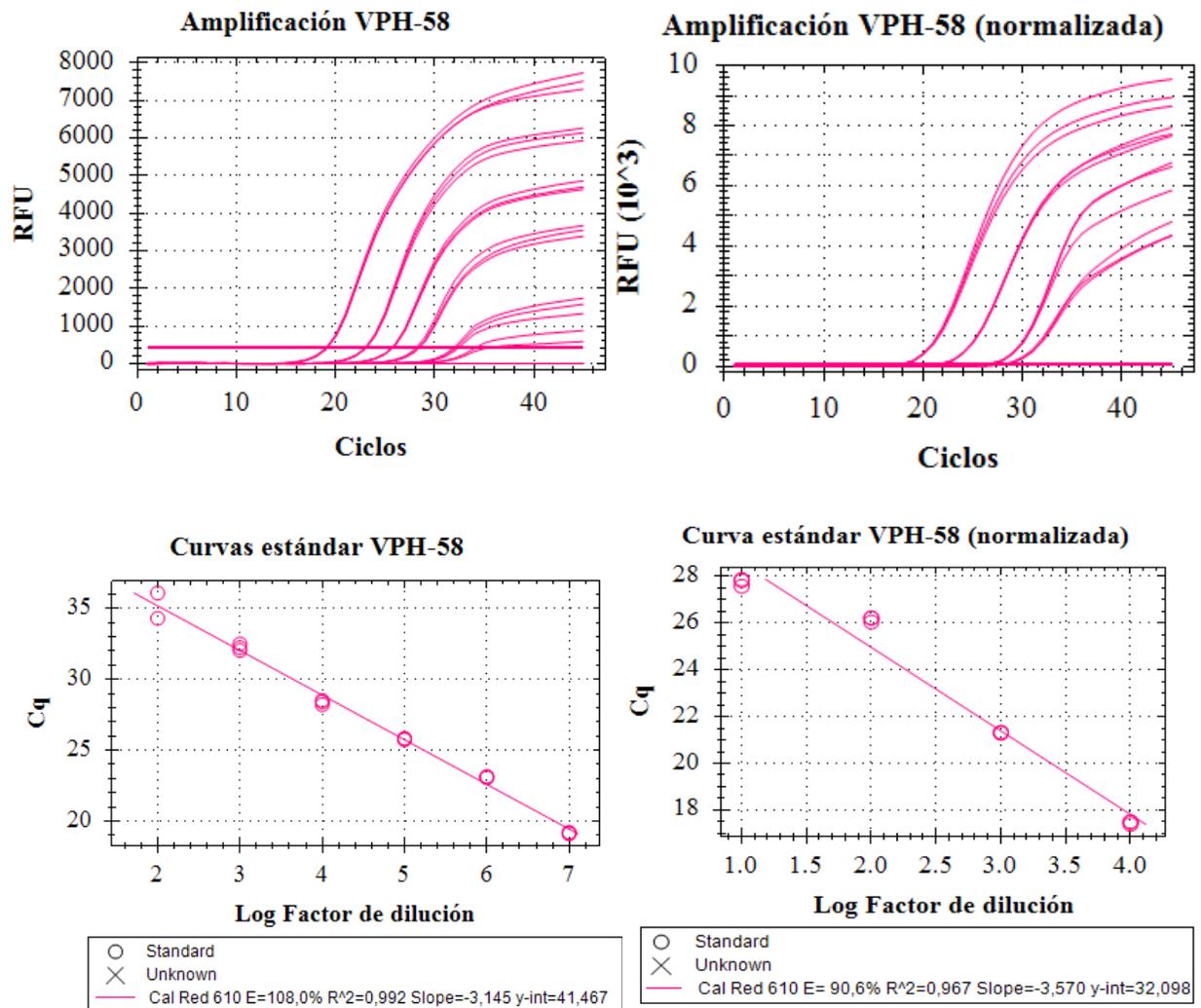
Apéndice J.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-56 a partir de la tercera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



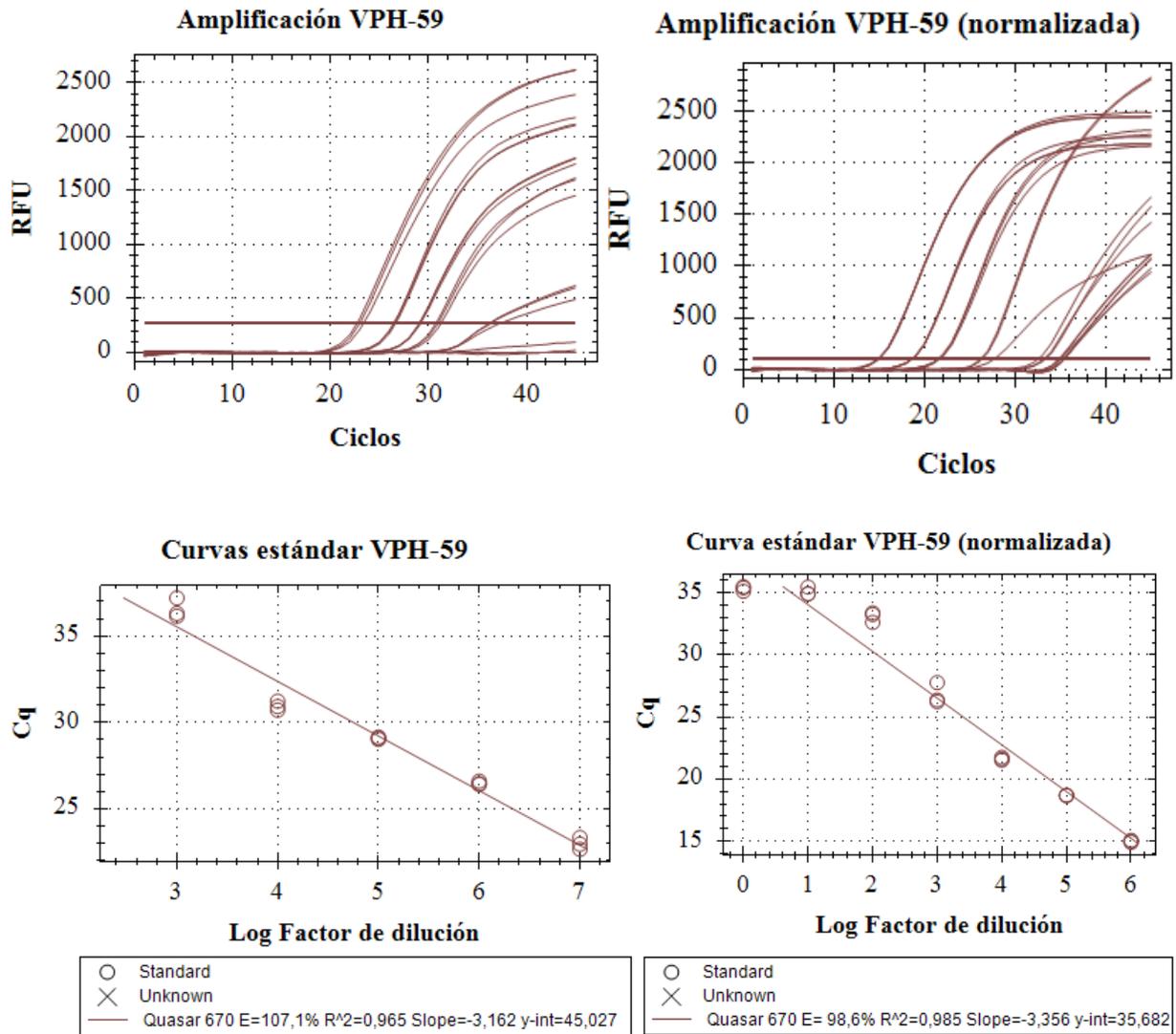
Apéndice K.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-58 a partir de la tercera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



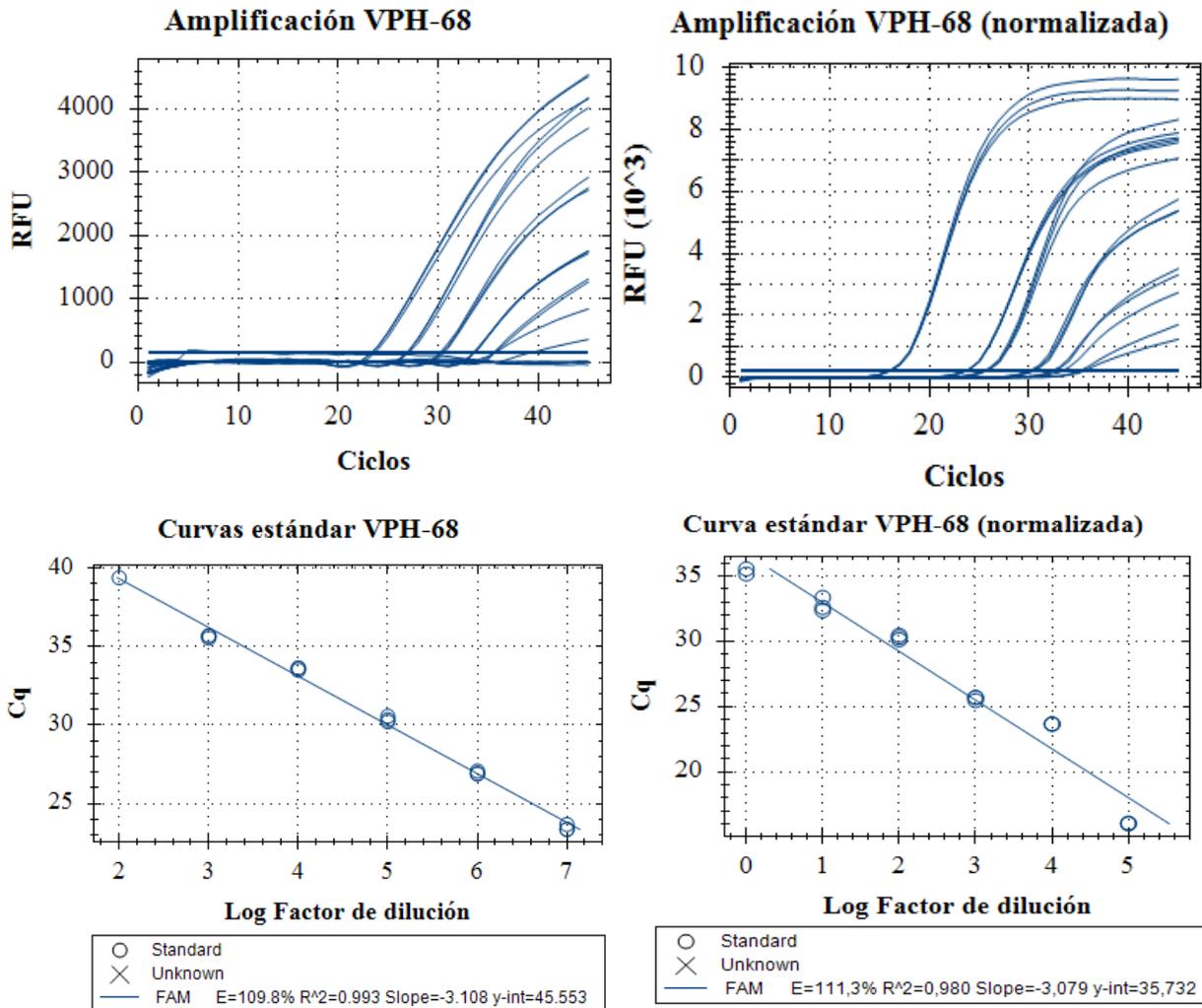
Apéndice L.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-59 a partir de la tercera multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



Apéndice M.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-68 a partir de la cuarta multiplex antes y después de la normalización por ddPCR



Apéndice N.

Curvas de amplificación y estándar de VPH-73 a partir de la cuarta multiplex antes y después de la normalización por ddPCR

