



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

**Facultad de Ingeniería Marítima, Ciencias Biológicas, Oceánicas y
Recursos Naturales**

«Genotipificación del Virus del Papiloma Humano mediante secuenciamiento y
PCR cuantitativa en tiempo real y detección de variantes intratípicas por análisis
filogenético»

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

Lex Guillermo Medina Magües

GUAYAQUIL – ECUADOR

2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia, en especial mis padres y abuelos que supieron guiarme y ayudarme durante mi formación académica.

A mis profesores: Ac. César Bedoya Pilozo, M.Sc.
 Blgo. Washington B. Cárdenas, Ph.D.
 Dra. Elba Camba Campos.

Por sus enseñanzas y entrega en su profesión académica.

A mis amigas y amigos.

La presente tesis fue realizada gracias a la ayuda del personal técnico del Proyecto VPH del INSPI, en especial a las Blgas. Alejandra Ibarra y María Quimis. Y gracias al apoyo del personal del Laboratorio de Biomedicina de la ESPOL. Un grato agradecimiento a la SENESCYT por el financiamiento de la tesis; al INSPI, ESPOL, UCSG y CIBE.

DEDICATORIA

Esta tesis es dedicada a mi familia.

TRIBUNAL DE GRADUACIÓN

Ac. Jerry Landivar Z, M.Sc.
PRESIDENTE

Ac. César Bedoya Piloza, M.Sc.
DIRECTOR DE TESIS

Blgo. Washington Cárdenas M, Ph.D.
MIEMBRO

Mercy J. Borbor Cordova, Ph.D.
MIEMBRO

DECLARACIÓN EXPRESA

«La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL».

Lex Guillermo Medina Magües

RESUMEN

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es el agente de transmisión sexual más común en el mundo. Este virus causa el 99% de los casos de cáncer cervicouterino, por lo tanto, la detección, genotipificación y el grado de progresión de este virus es esencial para la prevención del cáncer citado. Para esto, existe una amplia gama de ensayos que desarrollan esa función. Los ensayos actuales de genotipificación varían entre sí en su sensibilidad y especificidad; por lo cual, el objetivo de esta tesis fue el de evaluar la genotipificación de un nuevo ensayo llamado Anyplex II HPV28 (H28) con el estándar de oro que es el secuenciamiento, comparando sus resultados; y conocer las variantes del VPH presentes en Ecuador por medio de análisis filogenéticos del VPH16 y 58, ya que éstas presentan diferentes patologías. El secuenciamiento con Sanger (utilizando cebadores MY) se utilizó para evaluar al ensayo llamado Anyplex II HPV28 (Seegene) de multiplex PCR semicuantitativa en tiempo real, que cuenta con tecnología única que permite una alta especificidad y la genotipificación de 28 genotipos del VPH en forma semicuantitativa, viendo así posibles coinfecciones y su carga viral.

De 139 muestras, la concordancia entre el genotipo encontrado por secuenciamiento y el genotipo encontrado con mayor carga viral (menor ciclo de cuantificación «Cq») con el kit Anyplex II HPV28 fue de 64% (Spearman rho= 0.5615; $p < 0.0001$); mientras que, con todos los genotipos encontrados en coinfecciones por el kit Anyplex fue del 85.6% (Spearman rho=0.8147; $p < 0.0001$).

Los análisis filogenéticos del VPH 16 mostró que el 79.4% de las secuencias analizadas, pertenecen al linaje A (Europea) y el 20.6% pertenecen al linaje D. Por otro lado, el análisis del árbol filogenético del VPH 58 mostró que, el 94% de las secuencias analizadas pertenecen al linaje A y el 6% al linaje C. La utilización del secuenciamiento, que es considerado el estándar de oro para la genotipificación del VPH, permitió evaluar la genotipificación de Anyplex II HPV28 y dando muy buenos resultados en la detección de coinfecciones. Este estudio proporciona información sobre cómo mejorar la genotipificación y el panorama epidemiológico de las coinfecciones, mediante la evaluación de H28. Las secuencias analizadas dan conocimiento de los linajes del VPH presentes en parte de la población femenina ecuatoriana.

La concordancia encontrada da una moderada correlación positiva entre el genotipo encontrado en secuenciamiento y el de mayor carga viral en Anyplex II HPV 28 ($\rho > 0.5$); mientras que entre el genotipo encontrado en secuenciamiento y todos los encontrados en coinfecciones con Anyplex II HPV 28 tuvo una fuerte correlación positiva ($\rho > 0.75$).

Se identificó que el 20% de las variantes del VPH 16 pertenecen a una variante agresiva de éste; y gracias a este estudio se puede conocer las variantes más frecuentes del VPH 16 y 58 en Ecuador.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	VI
ÍNDICE GENERAL.....	IX
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE TABLAS	XV
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 1: MARCO TEÓRICO.....	3
1.1. INFORMACIÓN GENERAL.....	4
1.2. IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN DEL VPH	19
1.3. MÉTODOS PARA LA DETECCIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN DEL VPH.....	28
1.4. VARIANTES DE LOS GENOTIPOS DEL VPH.....	48
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....	52
2.1. MUESTRAS Y CONTROLES UTILIZADOS.....	53
2.2. EXTRACCIÓN DEL ADN.....	53
2.3. ENSAYO CON CEBADORES MY Y SECUENCIAMIENTO CON SANGER	54
2.4. ENSAYO CON EL KIT ANYPLEX II HPV28	57
2.5. ANÁLISIS DE DATOS	59
2.6. FILOGENIA	60

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	61
3.1. RESULTADOS.....	61
3.2. DISCUSIÓN.....	70
CAPÍTULO 4: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	74
4.1. CONCLUSIONES	75
4.2. RECOMENDACIONES.....	76
ANEXOS.....	77
ANEXO A.....	78
ANEXO B.....	81
ANEXO C	87
ANEXO D	92
ANEXO E.....	93
ANEXO F.....	94
ANEXO G	96
ANEXO H	100
ANEXO I.....	102
BIBLIOGRAFÍA.....	103

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

VPH	Virus del papiloma humano
PV	Papillomavirus
H28	Anyplex II HPV28
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNdc	ADN de doble cadena
ADNsc	ADN de simple cadena
ADNv	ADN viral
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AR	Alto riesgo
PAR	Posible alto riesgo
BR	Bajo riesgo
nt	Nucleótido
pb	Pares de bases
kb	Kilobases
dNTP	Desoxirribonucleótido
ddNTP	Didesoxirribonucleótido
ORF	Marco abierto de lectura
LCR	Región larga de control
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
M	Molar
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
mol	Mol

Mg	Magnesio
mg	Miligramo
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
ng	Nanogramo
%	Porcentaje
°C	Grado Celsius
min	Minuto
seg	Segundo
rxn	Reacción
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
Displasia	Cambios anormales en las células del epitelio cervical
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical (Alteraciones en la maduración y forma de las células del epitelio)
NIC 1	Displasia está en el tercio inferior del epitelio
NIC 2	Displasia está en los dos tercios inferiores del epitelio
NIC 2	Displasia está en más de los dos tercios inferiores del epitelio
Carcinoma	Cáncer con inicio en células epiteliales o glandulares
Episoma	ADN extracromosomal que puede replicarse
VLPs	Partículas similares a virus (<i>Virus-like particles</i>)
CP	Control positivo
NTC	Control negativo (<i>No template control</i>)

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. REPRESENTACIÓN ESTRUCTURAL DEL VPH	5
FIGURA 1.2. CLASIFICACIÓN DE LOS PAPILOMAVIRUS EN GÉNEROS, ESPECIES Y TIPOS.	8
FIGURA 1.3. REPRESENTACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN GENÓMICA DEL VPH.	11
FIGURA 1.4. PREVALENCIA DE LOS GENOTIPOS DE AR EN VARIAS REGIONES DEL MUNDO.	22
FIGURA 1.5. ESQUEMA DE LA ESTRUCTURA DE UN DPO™	38
FIGURA 1.6. VENTAJAS DEL USO DE UN DPO™ VERSUS CEBADORES NORMALES	39
FIGURA 1.7. ESQUEMA DEL FUNCIONAMIENTO DE UN DPO™ CON EL PITCHER	40
FIGURA 1.8. FUNCIONAMIENTO DEL PITCHER CON SU ETIQUETA (TAGGING) Y EL CATCHER	41
FIGURA 1.9. FUNCIONAMIENTO DE LA ETIQUETA (TAGGING) JUNTO AL CATCHER.....	41
FIGURA 1.10. ESQUEMA DE CAPACIDAD MULTIPLEX PARA DETECTAR VARIOS BLANCOS	42

FIGURA 1.11. ESQUEMA DEL ANÁLISIS CÍCLICO DE LA TEMPERATURA DE FUSIÓN DEL CATCHER (CYCLIC-CMTA).....	43
FIGURA 1.12. ANÁLISIS SEMICUANTITATIVO POR MEDIO DEL CYCLIC-CMTA.....	43
FIGURA 3.1 FRECUENCIA DE LOS TIPOS DEL VPH TOTALES ENCONTRADOS POR SECUENCIAMIENTO.	62
FIGURA 3.2. FRECUENCIA DE GENOTIPOS TOTALES ENCONTRADOS CON EL KIT ANYPLEX II HPV28.....	63
FIGURA 3.3 FRECUENCIA DE MONOINFECCIONES Y COINFECCIONES ENCONTRADAS CON ANYPLEX II HPV28.	64
FIGURA 3.4. FRECUENCIA DE GENOTIPOS ENCONTRADOS CON EL KIT ANYPLEX II HPV28 EN LA PRIMERA CURVA DE FUSIÓN.....	66
FIGURA 3.5. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE NEIGHBOR JOINING BASADO EN LAS VARIANTES DEL VPH 16	68
FIGURA 3.6. ÁRBOL FILOGENÉTICO DE NEIGHBOR JOINING BASADO EN LAS VARIANTES DEL VPH 58.	69
FIGURA 5.1 MÉTODOS DE SECUENCIAMIENTO DE MAXAM-GILBERT Y DE SANGER.	89

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA I. BREVE REPRESENTACIÓN TAXONÓMICA DEL VPH.....	9
TABLA II. TIPOS DE PAPILOMAVIRUS MÁS FRECUENTES Y SU RIESGO ONCOLÓGICO...	10
TABLA III. PREVALENCIA DEL VPH EN ALGUNOS PAÍSES DE AMÉRICA.	20
TABLA IV. PREVALENCIA DE LOS GENOTIPOS DEL VPH EN META-ANÁLISIS MUNDIAL...	21
TABLA V. CAPACIDAD DE DETECCIÓN DE DIVERSOS TIPOS DEL VPH POR VARIOS ENSAYOS.	44
TABLA VI. COMPARACIÓN ENTRE LOS DIFERENTES ENSAYOS PARA VPH	45
TABLA VII. VARIOS TIPOS DEL VPH CON SUS LINAJES Y SUBLINAJES CORRESPONDIENTES.	51
TABLA VIII. POSIBLES CASOS QUE PUEDEN OCURRIR EN LA DETECCIÓN.....	55
TABLA IX. COMPONENTES DE CADA REACCIÓN EN ANYPLEX II HPV28.	58
TABLA X. CICLADO QUE DETERMINA EL FABRICANTE EN ANYPLEX II HPV28.....	59
TABLA XI. INFECCIONES DOBLES ENCONTRADAS CON EL SECUENCIAMIENTO.	63
TABLA XII. APLICACIONES PARA CADA QUÍMICA V3.1 Y V1.1..	90

INTRODUCCIÓN

El Virus de Papiloma Humano (VPH) pertenece a la familia *Papillomaviridae*, caracterizado por ser esférico, sin envoltura y presentar ADN de doble cadena (1-4). El VPH es el agente de transmisión sexual más común en el mundo (5-7); afectando, al menos, al 70% de los adultos sexualmente activos en algún momento de su vida (8). El VPH oncogénico está asociado a más del 99% del cáncer cervicouterino y de lesiones precancerosas (9-11). En el Ecuador, este cáncer es la primera causa de muerte oncológica en mujeres (12).

El VPH ha convivido y coevolucionado junto a los humanos durante miles de años; por lo cual, ha variado y se han creado nuevos genotipos, variantes, linajes y sublinajes virales (13). Los genotipos más frecuentes del VPH oncogénico en el mundo son el VPH 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 (14,15). En el Ecuador distintos estudios concuerdan con una alta prevalencia del VPH 16, mientras que divergen en la prevalencia de los demás genotipos. A nivel mundial, esto se atribuye al uso de distintos ensayos para la genotipificación, los cuales usan cebadores distintos, no pueden detectar los genotipos o varían en su sensibilidad y especificidad.

La detección del genoma o los transcritos del VPH puede llevarse a cabo mediante Southern y Northern blots, dot blots, hibridación *in situ* (ISH), *Hybrid Capture* (Qiagen), secuenciamiento, PCR, qPCR, etc (16). Las infecciones del VPH son ampliamente diagnosticadas y genotipificadas mediante técnicas de biología molecular (2,7). Siendo, solamente el secuenciamiento del ADN viral capaz de genotipificar todos los genotipos, subtipos y variantes del VPH (16).

Las variantes intratípicas que presenta el VPH pueden diferir en la patogenicidad del virus, a pesar de que están relacionadas filogenéticamente (17). En el Ecuador, las variantes encontradas del VPH 16 fueron en un 85% la variante Europea y en un 15% la Africana (18). Sin tener hasta el momento más datos de los otros genotipos.

La presente tesis evaluó el uso en la genotipificación al ensayo Anyplex II HPV 28, mediante la comparación de los resultados con el secuenciamiento, para probar su tecnología única de genotipificación y conocer las coinfecciones presentes que no pueden ser determinadas por secuenciamiento. También generó información de las variantes circulantes de los VPH de mayor prevalencia, que son el VPH 16 y 58. Para llevar a cabo lo antes citado, se realizó los siguientes objetivos específicos:

1. Se realizó el diagnóstico molecular del VPH a muestras provenientes de varias provincias del Litoral ecuatoriano.
2. Se realizó la genotipificación de las muestras positivas mediante el secuenciamiento con el método de Sanger.
3. Se realizó la genotipificación de las muestras positivas con el ensayo Anyplex II HPV28.
4. Se construyó árboles filogenéticos a partir de las secuencias obtenidas de los genotipos VPH 16 y 58.

CAPÍTULO 1:

MARCO TEÓRICO

1.1. Información general

1.1.1. Virus

El VPH pertenece a la familia *Papillomaviridae*, caracterizado por ser esférico, sin envoltura, con 55 nm de diámetro y presenta ADN de doble cadena (ADNdc) (1-4). Posee una cápside icosaédrica formada por 72 pentámeros de su mayor proteína, la cápside (L1) (Figura 1.1); y una proteína menor, la cápside (L2) interna, que asociada a L1 forma la cubierta (2,4). Su genoma se encuentra dentro de la cápside, empaquetado a manera de minicromosoma con la ayuda de nucleosomas celulares (2). Su genoma es de alrededor de 8.000 pares de bases (pb) y es circular (1,2,19). A pesar de su tamaño pequeño, su biología molecular es muy compleja (19).

Normalmente su genoma cuenta con ocho marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) (1). Todos los ORF se encuentran en una sola hebra del ADN, por lo que la producción de los ARN mensajeros (ARNm) se lleva a cabo a partir de una sola hebra del ADN (20). Esta familia de virus es capaz de infectar tanto a mamíferos como a aves (3,19).

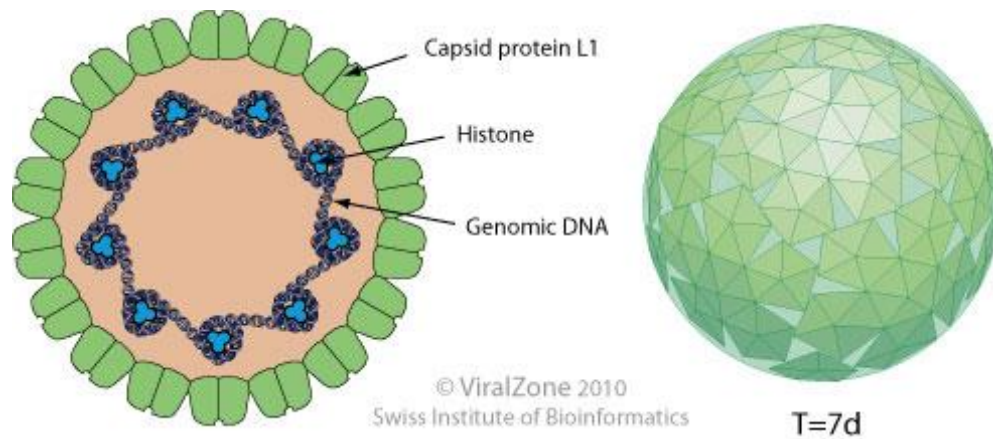


Figura 1.1. Representación estructural del VPH

Fuente: ViralZone (2010).

1.1.2. Filogenia y evolución del VPH

Estudios en filogenia sugieren que el VPH es monofilético, con origen en África y que coevolucionó con los humanos (21,22). Se ha encontrado que existen diferentes tasas evolutivas entre y dentro de los tipos de Papillomavirus (PV) para los diferentes ORF (13). Por lo que la coevolución no es el único mecanismo que

ha llevado a la diversificación de los PV (13). Un estudio de las variaciones del VPH 16 y 18 encontró una variación del 1 al 5% del LCR (Región larga de control) entre las variantes predominantes en el Este de Asia, Europa y África. Esto conlleva a decir, en base a la aparición de los grupos étnicos, que la velocidad de evolución es del 1% por cada 10.000 años en estos genotipos (22). La variante Europea del VPH 16 presente en África, Europa y Asia indica que esta existía antes que las otras variantes aparezcan (22).

La nomenclatura de los Papillomavirus a nivel de especie y taxonómicamente superior está regulada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV, por sus siglas en inglés), mientras que los niveles inferiores como los tipos son regulados por el Centro de Referencia Internacional del VPH (23).

Para la tipificación y respectiva numeración viral se utiliza un sistema basado en la secuencia del ADN del ORF L1 del virus y se compara su homología con otro tipo relacionado (23). La numeración de un nuevo tipo del VPH es dada sólo luego de haber sido secuenciado su genoma completo y almacenado en el centro de referencia antes citado (23).

1.1.3. Géneros, especies y tipificación viral

Para ser parte de un «género» diferente dentro de la familia *Papillomaviridae* se debe compartir menos del 60% de identidad con la secuencia del ORF L1 y entre el 23 al 43% de la secuencia entera del virus (19). Mientras que, las «especies» comparten entre el 60 al 70% de identidad en cada género (19). Los aislados del VPH son tradicionalmente llamados «tipos» o «genotipos» (19). Por medio de la clonación del genoma completo y secuenciamiento de L1 se determina si un VPH es lo suficientemente variable (más del 10% con respecto a otro tipo cercano) para lograr ser un nuevo tipo de VPH (12,19,24,25). Mientras que, un «subtipo» difiere en su secuencia génica del 2 al 10% con respecto al genotipo original; diferencias menores a 2% (más del 2% si es comparada con LCR) son consideradas «variantes» (4,12,19,22).

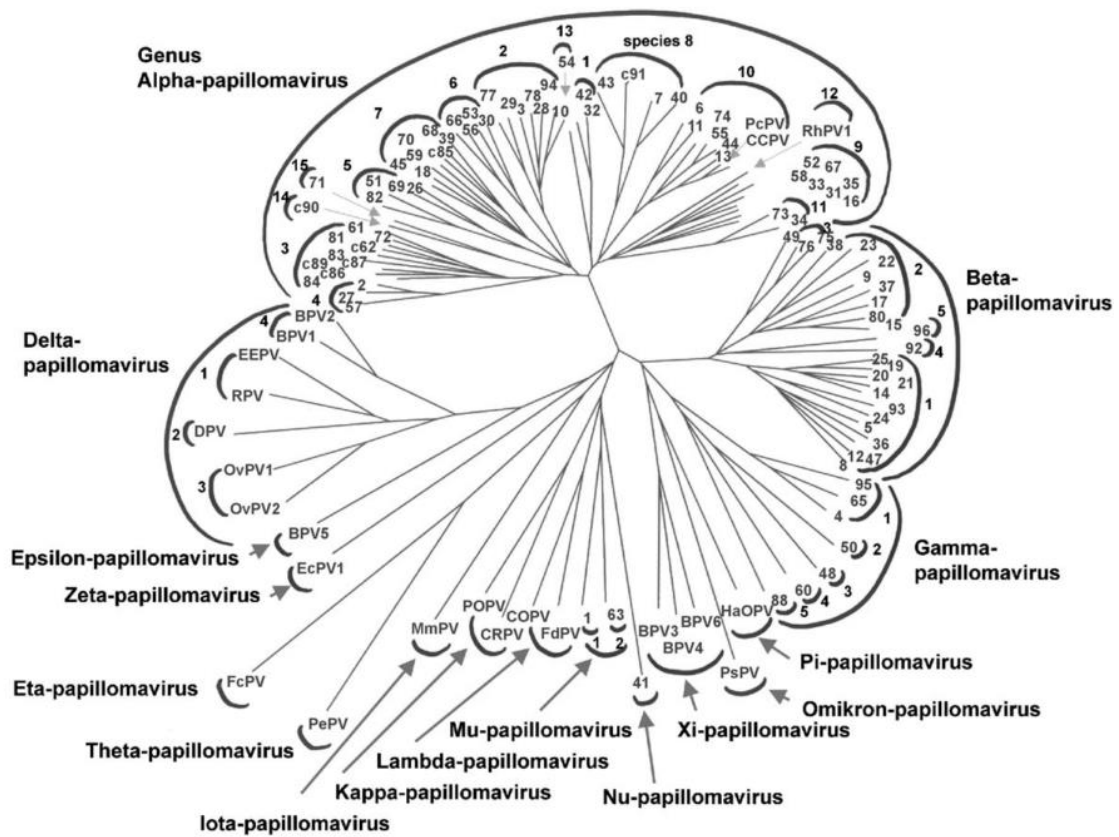


Figura 1.2. Clasificación de los *Papillomavirus* en géneros, especies y tipos.
Fuente: de Villiers, Ethel-Michele, *et al.* (2004).

Hasta el momento, según el Centro de Referencia Internacional del VPH se han identificado 198 genotipos del VPH basado en análisis de secuencias del ADN (23,26). La Tabla I muestra la localización taxonómica de los tipos del VPH hasta la última actualización del listado de virus de ICTV (27).

Familia	Géneros (39 en total)	Especie	Tipos del VPH
Papillomaviridae	<i>Alphapapillomavirus</i>	<i>Alphapapillomavirus 1al 14</i>	65 tipos
	<i>Betapapillomavirus</i>	<i>Betapapillomavirus 1al 6</i>	51 tipos
	<i>Gammapapillomavirus</i>	<i>Gammapapillomavirus 1 al 20</i>	79 tipos
	<i>Mupapillomavirus</i>	<i>Mupapillomavirus 1</i> <i>Mupapillomavirus 2</i>	3 tipos
	<i>Nupapillomavirus</i>	<i>Nupapillomavirus 1</i>	

Tabla I. Breve representación taxonómica del VPH.

Fuente: ICTV.

En el **ANEXO A y B** se muestra todos los géneros incluidos en la familia *Papillomaviridae* y sus tipos.

Estos han sido agrupados en dos grandes grupos, «Bajo Riesgo» y «Alto Riesgo» oncogénico. Algunos tipos del VPH de Bajo Riesgo (BR) oncogénico como el 6 y 11, producen condilomas benignos o verrugas y, raramente, papilomatosis respiratoria (5,28-31) (Tabla II). Mientras, algunos tipos del VPH de Alto Riesgo (AR) oncogénico, como el 16 y 18, se encuentran asociados a la carcinogénesis cervical y son considerados los tipos más oncogénicos (5,29-31). El VPH 16 y 18 se relacionan remotamente, por lo que se los designa en grupos filogenéticos o «especies» diferentes; estando el VPH 16 en la especie nueve y el VPH 18 en la especie seis (22).

Se conoce que los subtipos del VPH son raros, mientras que las variantes que presenta cada tipo del VPH son numerosas (entre 10 a 100 variantes); pero en comparación a los virus de ARN formando cuasiespecies, es sumamente baja (22).

Género	Especie	Tipos	Riesgo
<i>Alphapapillomavirus</i>	4	VPH 2, 27 y 57	VPH de bajo riesgo
	5	VPH 26, 51, 69 y 82	VPH de alto riesgo
	6	VPH 30, 53, 56 y 66	VPH de alto riesgo
	7	VPH 18, 39, 45, 59, 68 y 70	VPH de alto y bajo riesgo
	8	VPH 7, 40 y 43	VPH de bajo riesgo
	9	VPH 16, 31, 33, 35, 52, 58 y 67	VPH de alto riesgo
	10	VPH 6, 11, 13, 44 y 74	VPH de bajo riesgo
<i>Betapapillomavirus</i>	1	VPH 5 y 8	VPH de bajo riesgo
<i>Gammapapillomavirus</i>	1	VPH 4 y 65	VPH de bajo riesgo

Tabla II. Tipos de *papillomavirus* más frecuentes y su riesgo oncológico.

Fuente: (19,32).

1.1.4. Organización genómica

El VPH se encuentra dividido en tres zonas o regiones llamadas: región temprana, región tardía y región regulatoria corriente arriba (URR, por sus siglas en inglés) o también llamada región larga de control (LCR, por sus siglas en inglés) (1,2,33,34) (Figura 1.3). Los ORF que presenta pueden superponerse uno sobre otro.

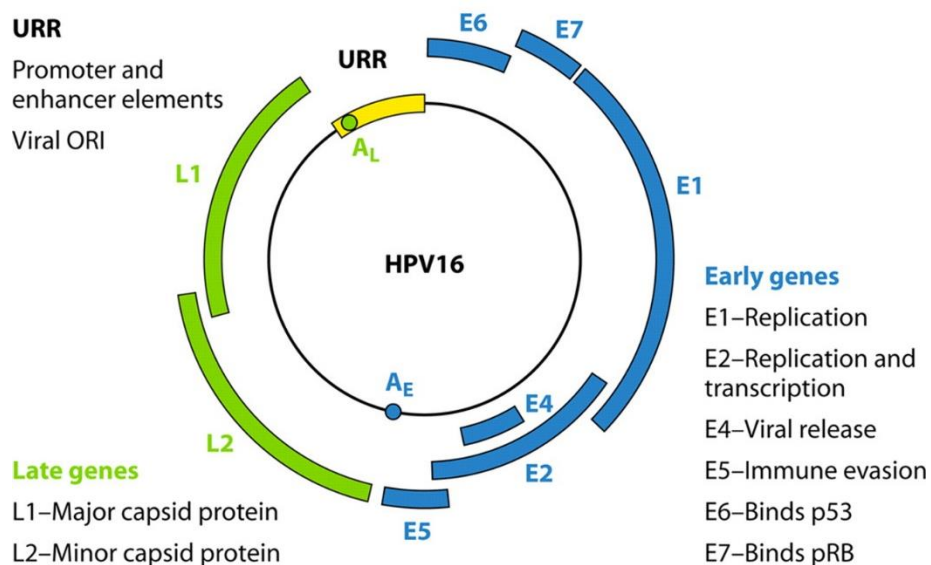


Figura 1.3. Representación de la organización genómica del VPH.

Señal de poly(A) temprana (A_E); Señal de poly(A) tardía (A_L).

Fuente: Stanley, M (2012).

Región temprana

Esta región representa el 45% del genoma total del VPH, su función se centra en el control de la replicación viral (1). Su nombre proviene del inglés «Early: E».

Presenta normalmente seis marcos abiertos de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) y en algunos tipos del VPH presenta ocho ORFs (1,4). Entre los ORF de la región temprana del VPH y que forman polipéptidos con el mismo nombre se encuentran los siguientes:

E1:

Es la única enzima producida por el VPH, tiene capacidad de unirse a la secuencia viral replicadora (*ori*) y presenta actividad ADN helicasa (ADN helicasa dependiente de ATP) (26,28). Es una enzima esencial para la replicación y amplificación del genoma del VPH (35). Su función se basa en desenrollar el ADN viral y producir una horquilla de replicación para que los factores de transcripción puedan interactuar con el ADN viral.

E2:

Esta proteína tiene como función la regulación de la transcripción, el inicio de la replicación y la partición viral (35). Para la replicación viral (además de E1 y E2) es necesaria la secuencia *ori*, siendo el conjunto de estos tres componentes necesario y suficiente para la replicación del virus en células de mamíferos (32). Experimentos han mostrado que E2 es esencial y juega un papel importante en

la replicación viral, actuando como factor de transcripción y de regulador de E6 y E7 (4,32).

E4:

Actúa en la maduración y replicación (1,2). Junto a E5 son expresados en las capas superiores del epitelio y, conjuntamente con E1 y E2 participa en la amplificación del ADN viral (36). Se sugiere que E4 se une a los filamentos de queratina e interrumpe su estructura para la liberación del virión (36,37). Este ORF es muy variable entre los distintos genotipos del VPH (37).

E5:

Es una proteína pequeña de transmembrana (35). Estimula la proliferación y transformación viral (1,2). Interactúa con el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés) e inhibe la expresión de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad «MHC I y MHC II» (4). Este polipéptido estimula la producción del ADN viral en queratinocitos primarios, y beneficia la actividad transformante de los oncogenes E7 del VPH de AR, las proteínas ras y el EGFR activado (32). Se ha descubierto que E5 modifica las características físicas y la composición de la membrana celular (32).

E6:

Es una oncoproteína transformante (1,2,19). El polipéptido E6 está formado por alrededor de 150aa (38). No se ha encontrado que la proteína E6 tenga función enzimática (38). Las interacciones proteínas-proteínas son las encargadas de mediar las actividades de la proteína E6 (38). La proteína asociada E6 (E6AP, por sus siglas en inglés) junto a la ubiquitina ligasa E3 son las primeras en interactuar con E6 (38). La interacción más estudiada de la proteína E6 es la realiza con el supresor de tumor p53. La proteína 53 (p53) normalmente está presente en niveles bajos y no activada transcripcionalmente; si hay daño celular, los niveles aumentan y se activan modificaciones post-traduccionales (38). Cuando p53 es activada, se inicia la reparación del ADN, la detención del ciclo celular o la apoptosis, dependiendo de la magnitud del daño existente (38). La activación de p53 también se lleva a cabo por infección del VPH (38).

Los VPH infectan la capa basal del epitelio, pero para su replicación necesitan células diferenciadas (que apagan su maquinaria de replicación del ADN al terminar su ciclo celular) (38). Por lo cual, el VPH debe activar la replicación del ADN celular y bloquear la actividad de p53 para replicarse (38). Los VPH de AR bloquean la actividad de p53 mediante su degradación por la vía ubiquitina-proteosoma (38). Para la degradación de p53, E6 debe unirse al dominio de reconocimiento de sustrato de E6AP para ser inmovilizado y ubiquitinado (38).

Tanto las proteínas E6 de los VPH de AR y BR pueden interactuar con p53 y ambos pueden unirse al extremo c-terminal, pero sólo la proteína E6 del VPH de AR puede unirse al núcleo de dominio de unión al ADN de p53 (p53DBD, por sus siglas en inglés) (38).

Otro mecanismo en la que E6 inactiva p53 es mediante su secuestro en el citoplasma, utilizando su unión al extremo c-terminal de p53 y enmascarando la señal de localización nuclear (NLS, por sus siglas en inglés) (38).

E7:

Este ORF se codifica posterior a E6 y está formado de alrededor por 100 aa, aproximadamente (38). También es una oncoproteína transformante (1,2,19). Para algunas células epiteliales humanas, la expresión de E7 es suficiente para producir la inmortalización celular, pero en los VPH de BR muestran menor capacidad de inmortalización y transformación (32). La expresión de E7 del VPH de AR causa inestabilidad a nivel del genoma del huésped (32). Las funciones más estudiadas son las relacionadas a pRb/p107/p130, ya que regulan la progresión del ciclo celular, así como las actividades de los factores de transcripción E2F (32). Miembros de la familia de E2F (como E2F-1, E2F-2 y E2F-3) se encuentran asociados a la proteína del retinoblastoma (pRb) y otros miembros, como E2F-4 y E2F-5, interactúan prioritariamente con la proteína tipo-

retinoblastoma 1 (p107) y la proteína tipo-retinoblastoma 2 (p130); mediante esta asociación las oncoproteínas virales inducen un estado de fase-S aberrante en el ciclo celular (32). Las proteínas E7 del VPH de AR causa la transformación celular mediante la interacción estequiométrica con pRb/p107/p130, activando aberrantemente E2F (32).

Región tardía

Del inglés «Late: L», representa el 40% del genoma del virus y presenta dos genes (L1 y L2), encargados de generar las proteínas de la cápside (1,2). Una vez que la replicación del ADN viral se ha llevado a cabo, se expresa estas proteínas para luego empezar el ensamblaje y completar el virión (36). La expresión de estos ORFs se lleva a cabo en queratinocitos diferenciados (20).

L1:

Presenta alrededor de 360 moléculas formando la cápside del virus (4). Los monómeros de L1 en su núcleo se componen de 20 a 382 residuos, con un total de 504 aa para L1 del VPH 16; y figura como un barril β de ocho hebras antiparalelas (39). Para generar estabilidad en el ensamblaje de la cápside son necesarios enlaces disulfuros (39). Tiene la función de interactuar con el receptor celular y presenta actividad inmunogénica útil para el desarrollo de vacunas (39).

L2:

L2 es de menor tamaño y forma parte de la cápside, presentando doce moléculas en ella (4). A pesar de su función estructural tiene otras funciones importantes en la localización de los componentes de la cápside (32,39), y, se sugiere que ayuda al transporte de la cápside por el citoplasma (39). L2 contribuye a la unión del virión con la superficie celular y ayuda a su empaquetamiento (39). Al igual que L1, puede ser utilizada como herramienta por su actividad inmunogénica (39).

Región larga de control

Representa el 15% del genoma viral y controla la expresión de los genes E6 y E7 (1,2,20). La región larga de control (LCR, por sus siglas en inglés) es una región no codificante o URR «upstream regulatory región» que contiene muchos elementos como el origen de replicación (*ori*), regiones de unión del ADN viral con la proteína E2, promotores para la región temprana y zonas para la unión de factores de transcripción de células epiteliales (4).

1.1.5. Transformación e Integración viral del VPH oncogénico

Algunos tipos del VPH, como por ejemplo el VPH 16, 18, 31, 33 y 45, se encuentran fuertemente asociados al desarrollo de cáncer y al desarrollo de altos

grados de NIC «Neoplasia intraepitelial cervical» que otros genotipos (40). Esto es debido a que las oncoproteínas E6 y E7 del VPH de AR tiene una habilidad transformante mayor que la de los VPH de BR (40). La habilidad transformante mediante la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, quienes inactivan p53 y miembros de la familia pRb, son vitales para el ciclo viral (41). Se ha descubierto que la expresión de las oncoproteínas *in vitro* es suficiente para la inmortalización celular; mientras, *in vivo* no lo es, por lo que se sugiere eventos genéticos secundarios para lograrlo (41).

La integración viral del VPH de AR oncogénico es considerada un evento clave en la progresión de un grado NIC a cáncer invasivo (42). La mayoría de los carcinomas presentan integración viral en el genoma del huésped (2,43). En la carcinogénesis, E2 es parcialmente eliminada, aumentando la expresión de las oncoproteínas E6-E7 (2). Estas oncoproteínas en VPH de AR bloquean las funciones de las proteínas p53 y pRb respectivamente (2). La supresión de las funciones de las proteínas p53 y pRb elimina la capacidad de la célula infectada de entrar en apoptosis, logrando la inmortalización celular y permitiendo la inestabilidad del genoma del huésped (2). Nuevos datos revelan que la integración viral al genoma huésped puede ser utilizada como marcador para la progresión a NIC 2 o NIC 3 (42).

1.2. Importancia de la investigación del VPH

Toda persona con una vida sexual activa puede infectarse con VPH, produciendo a veces, sintomatología años después del contacto sexual inicial (8,42). Este virus puede ser propagado al tener sexo vaginal, anal u oral con una persona infectada con el virus o asintomática, mediante contacto de los genitales piel con piel (8,16,28), mediante transmisión vertical (de madre a hijo), e incluso, raramente, con besos con la boca abierta «besos franceses o besos profundos» (44-49). El VPH, usualmente desaparece del cuerpo luego de la infección, sin causar problemas de salud; pero, pueden existir infecciones persistentes que representan un problema y peligro para la salud, como lo son las verrugas anogenitales y el cáncer (8,16,42).

El VPH infecta células epiteliales y puede causar desde verrugas, hasta neoplasia y cáncer (11). Las infecciones persistentes del VPH oncogénico pueden causar cáncer cervicouterino, de pene, anal, entre otros (6,15).

1.2.1. Infecciones múltiples del VPH

Las coinfecciones con VPH ocurren comúnmente (16). Las infecciones múltiples por VPH se encuentran entre el 10 al 20% de los casos confirmados del VPH (29). Según la literatura, la mayoría de infecciones múltiples o coinfecciones son dobles, existiendo también infecciones triples, cuádruples y quintuples (2). En

pacientes con citología normal y ASCUS, ha sido encontrado que un 11.8% de éstas presenta infecciones múltiples con al menos un genotipo de AR; mientras que con NIC1 y 2 un 34.5% (2).

1.2.2. Epidemiología molecular de los genotipos del VPH en el mundo

La presencia del VPH 16 y 18 representan el 70% del cáncer cervicouterino en el mundo (5,7,31,50). El VPH 16 es el de mayor prevalencia a nivel mundial (29); siendo detectado entre el 54 al 55% de los casos de cáncer cervicouterino y en el 45% de NIC 2 y 3 (9). Los genotipos más frecuentes del VPH de AR son el 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58 (14,15); y están asociados a la producción del 80% del cáncer cervicouterino y de NIC 2 y 3 (9).

País	VPH 16 (%)	VPH 18 (%)
Argentina	59,6	14
Bolivia	34,7	4,1
Brasil	52,2	8,7
Chile	45	5
Colombia	52,6	7,9
Cuba	57,8	6,7
Panamá	46,6	15,1
Paraguay	54,7	11,1
Suriname	49	19

Tabla III. Prevalencia del VPH en algunos países de América.

Fuente: Lewis, Merle J. (2004).

Cáncer invasivo	
Tipo	%
VPH 16	54,4
VPH 18	15,9
VPH 33	4,3
VPH 45	3,7
VPH 31	3,5
VPH 58	3,3
VPH 52	2,5
VPH 35	1,7
VPH 39	1,29
VPH 59	1,28
VPH 51	1,16
VPH 56	0,78
VPH 68	0,61
VPH 73	0,48
VPH 6	0,45
VPH 53	0,42
VPH 66	0,39
VPH 70	0,33
VPH 82	0,27
VPH 11	0,2
VPH 26	0,13

Tabla IV. Prevalencia de los genotipos del VPH en meta-análisis mundial.

Fuente: IARC v100 (2012).

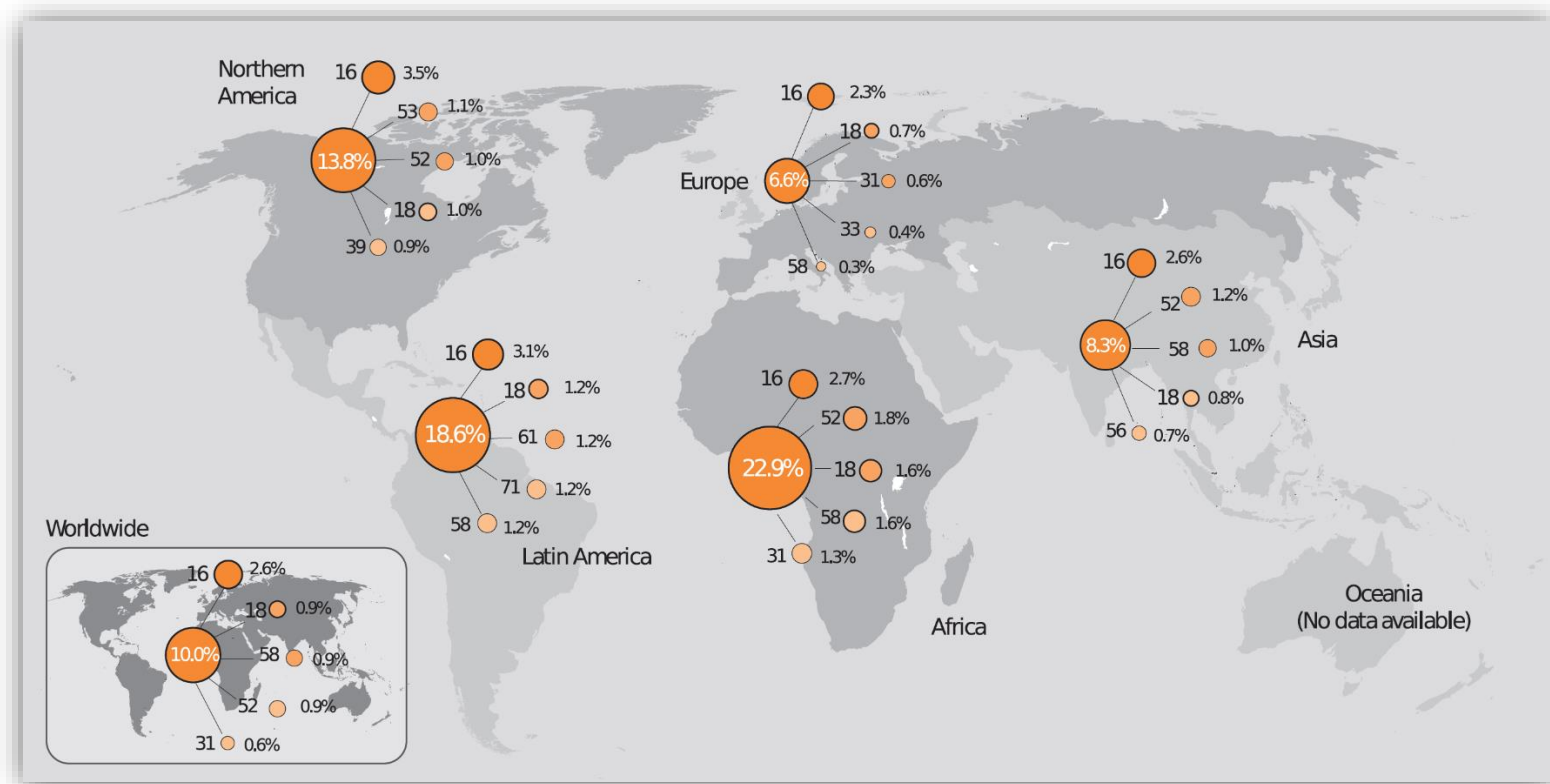


Figura 1.4. Prevalencia de los genotipos de AR en varias regiones del mundo.

Fuente: IARC v100 (2012).

1.2.3. Epidemiología molecular de los genotipos del VPH en Ecuador

Pocos estudios se han enfocado en la epidemiología del VPH, debido a la subvaloración del VPH dentro de la población ecuatoriana. El cáncer cervicouterino en Ecuador es la primera causa de muerte oncológica en mujeres (12). En el 2004, un estudio piloto que planteó investigar la incidencia del VPH en mujeres (71 casos), encontró una prevalencia del 43.7% de mujeres con VPH; mostrando una prevalencia del VPH en el 37.5% de casos de inflamaciones de la cérvix, 44.8% en pacientes con NIC 1 y 60% en mujeres con NIC 2 y 3 (18). Los tipos del VPH con mayor prevalencia en este estudio fue el VPH 16 (64.5%), VPH 81 (29%) y los VPH 31, 53, 56 y 58 (18).

Otro estudio realizado en el 2009, en la Provincia de Santa Elena, mostró una prevalencia del VPH del 24.2%, con una alta prevalencia en la población estudiada (302 mujeres) de los tipos VPH de AR (VPH 16, 52, 58 y 59) y de BR (VPH 62, 71, 72 y 83) (51).

En el 2010, Solca Guayaquil realizó un estudio piloto con 140 pacientes, de las cuales el 76.4% fueron positivas para VPH, distribuidos en VPH 18 con el 15.78%, VPH 33 con el 10%, VPH 16 con el 9.29% y VPH 31 con el 5.71% (52).

Un reciente estudio del 2014, con una población de 110 mujeres, mostró una prevalencia del 72.7% para el VPH de AR (12), con el VPH16 en el 48.75% de los casos, seguido del VPH 66 con el 11.5%, el VPH 43 con el 8.75% y el VPH 18 con el 7.5% (12).

Algunos problemas asociados a la prevalencia de cáncer cervicouterino en Ecuador, son consecuencia de la poca rutina de someterse a exámenes de detección de este cáncer y la falta de acceso masivo a estos exámenes, ya sea por problemas económicos o por logística (51).

1.2.4. Vacunación

Está recomendada para mujeres y hombres, heterosexuales y homosexuales, en especial, para personas con sistema inmune comprometido (8). La vacunación en mujeres, ha sido descrita como el mecanismo de prevención de lesiones precancerosas y cáncer cervicouterino (5,16,53).

Es conocida la expresión de E6 y E7 en tumores invasivos, por lo cual el desarrollo de vacunas basadas en E6 y E7 ha sido impulsado (40). La cápside, con sus estructuras repetitivas es inmunogénica (39). Recientemente la vacunación se ha enfocado en el ORF L1 y L2 del VPH ya que estos producen altos títulos de anticuerpos que pueden neutralizar una futura infección (39,40).

A medida que se descubran nuevas variantes del VPH, las nuevas vacunas deben incorporar esas variaciones en sus formulaciones para hacerlas más efectivas (40). En la actualidad se encuentra disponible dos vacunas: la tetravalente (Gardasil®; Merck & Co.) y la bivalente (Cervarix®; GlaxoSmithKline)

(16,47,54,55). Las nuevas generaciones de vacunas se centran en el desarrollo de vacunas multivalentes como la Gardasil® 9 (56,57).

Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals)

Es una vacuna bivalente aprobada en el 2009, que protege sólo contra los tipos de AR (VPH 16 y 18) (47,58). Es una vacuna recombinante no infecciosa, con el adyuvante AS04 que contiene a la proteína L1 recombinante del VPH 16 y 18 (58). Utiliza tres dosis para generar la protección y que, se realizan luego de uno y seis meses después de la primera inyección (58). Para la producción de las proteínas L1 individuales se utiliza el sistema de vectores de expresión de Baculovirus recombinante en un medio de cultivo rico en vitaminas, lípidos, aminoácidos y sales minerales (58). La producción de las proteínas L1 con el sistema Baculovirus recombinante se realiza en células de insecto *Trichoplusia ni* (58). Las proteínas L1 son liberadas del citoplasma y purificadas por medio de métodos cromatográficos y de filtración (58). Al finalizar el proceso de purificación las proteínas L1 son ensambladas en partículas similares a virus (*virus-like particles*, VLPs) (58). La purificación es absorbida en aluminio y se prepara con el sistema adyuvante AS04 en cloruro de sodio, fosfato sódico dihidrato y agua para la inyección (58).

Gardasil® (Merck & Co., Inc.)

Esta vacuna tetravalente protege al individuo contra los VPH de BR (VPH 6 y 11) y de AR (VPH 16 y 18) (59). En el 2006, la Administración de Alimentos y Drogas de los Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) licenció el uso de la vacuna tetravalente en mujeres de 9 a 26 años y en el 2009, en hombres, en el mismo rango de edad (50,59,60). La inmunización se realiza en tres dosis, con periodos de dos y seis meses después de la dosis inicial (59). Es una vacuna tetravalente recombinante no infecciosa, a partir de VLPs de ORF L1 de los VPH 6, 11, 16 y 18 (59). Las proteínas L1 se producen con la fermentación separada del recombinante *Saccharomyces cerevisiae* en un medio de fermentación con vitaminas, carbohidratos, sales minerales, aminoácidos; y el auto-ensamblado VLPs (59). Los VLPs son purificados por medios químicos y físicos, a partir de las células de levadura, para luego ser absorbidos por el adyuvante preformado que contiene aluminio (59). La solución estéril final contiene los VLPs absorbidos, adyuvante adicional con aluminio y un tampón de purificación final (59).

Gardasil® 9 (Merck & Co., Inc.)

Es una vacuna de nueve valencias, capaz de dar protección contra los VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 (57). Fue aprobada en Estados Unidos, en el año 2014, para el uso en mujeres de nueve a 26 años de edad. El protocolo de inmunización consiste en tres dosis, con periodos de tiempo de dos a seis meses

luego de la dosis inicial (57). Consiste en una vacuna no infecciosa, recombinante, preparada a partir de VLPs purificados del ORF L1 de los VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 (57). Para la producción de las proteínas L1 se utiliza fermentación separada, con la levadura recombinante *Saccharomyces cerevisiae*, en medio de fermentación con vitaminas, carbohidratos, sales minerales, aminoácidos; y el auto-ensamblado VLPs (57). Los VLPs son purificados de las células de levadura por medios químicos y físicos, para luego ser absorbidos por el adyuvante preformado que contiene aluminio (57). La solución estéril final contiene los VLPs absorbidos en adyuvante adicional con aluminio y un tampón de purificación final (57).

La proyección de vacunación contra el VPH a nivel mundial, desde el año 2011 hasta el 2020, se ha estimado que será capaz de evitar medio millón de muertes futuras, o 15,1 muertes por cada 1.000 niñas vacunadas (53). La aceptación de la vacuna en Estados Unidos es baja; mostrando un estudio nacional que el 54% de niñas de entre 13 a 17 años recibieron una dosis de la vacuna del VPH; mientras, que el 33% recibió las tres dosis necesarias (50).

1.2.5. Carga viral

Las infecciones persistentes tienen la capacidad de aumentar la carga del ADN del VPH por medio de la replicación viral (31), por lo que la carga viral es considerada un marcador auxiliar de infecciones persistentes del VPH (61).

La carga viral del VPH de AR parece estar dependientemente relacionada al desarrollo de altos grados de NIC y de cáncer invasivo (2,3,6,42,61). Por lo cual, la medición de la carga viral del VPH puede mejorar el valor predictivo, identificando mujeres con mayor riesgo de progresión de NIC (3,61,62).

Se conoce poco acerca de la carga viral específica para cada tipo del VPH y su relación con la infección del VPH (42). La carga viral, en su mayoría ha sido estudiada en mujeres adultas y con presencia de NIC (42). Transmisión vertical (de madre a hijo) del VPH puede ocurrir si la madre presenta una alta carga viral en el momento del parto (16).

1.3. Métodos para la detección y genotipificación del VPH

Las infecciones del VPH son ampliamente diagnosticadas y tipificadas mediante técnicas de biología molecular (2,7). Otros métodos de diagnóstico, como el cultivo y propagación *in vitro* del virus no son prácticos; además la sensibilidad de métodos serológicos no es satisfactoria (2).

La detección del genoma o los transcriptos del VPH puede llevarse a cabo mediante Southern y Northern blots, dot blots, hibridación *in situ* (ISH), *Hybrid Capture* (Qiagen), secuenciamiento, PCR, qPCR, entre otros (16). Siendo solamente el secuenciamiento del ADN viral (ADNv) capaz de detectar todos los genotipos, subtipos y variantes del VPH (16). Para ello se debe clonar en un vector o secuenciar directamente un amplicón generado por PCR (16).

La importancia de la detección y genotipificación del VPH y de marcadores asociados, ha llevado al desarrollo de muchos métodos para la detección, algunos de los cuales se describen a continuación.

1.3.1. Ensayos para la detección del VPH

PCR de amplio espectro para detectar VPH

Utiliza cebadores generales o *consensus* para la detección de un amplio espectro de tipos del VPH (2). Los cebadores más utilizados para este fin son los MY09/11, PGMY, GP5+/6+ y SPF₁₀ (2). Estos cebadores se hibridan al ORF L1 del VPH, en regiones conservadas o variables de éste (2,63). Luego de haber desarrollado la PCR (conociendo la presencia del VPH) y si se desea saber el tipo específico del VPH presente, se puede utilizar diversos métodos como: análisis con *restriction*

fragment length polymorphism (RFLP), *reverse line blotting* (RLB) y secuenciamiento del ADN amplificado (2).

El secuenciamiento es el estándar de oro para la genotipificación de tipos del VPH, ya que proporciona información útil de la secuencia y de posibles mutaciones (2). Pero el secuenciamiento normal (i.e., método de Sanger) tiene una gran desventaja al poder existir infecciones múltiples del VPH en una muestra; esto conlleva a la generación de secuencias mezcladas de distintos tipos del VPH y su interpretación es extremadamente difícil (2,63). El uso del pirosecuenciamiento junto al método de cebadores de secuenciamiento múltiple, permite la detección de varios genotipos de una infección múltiple a bajo costo y con gran precisión (2). Información básica y funcionamiento del secuenciamiento y pirosecuenciamiento puede ser vista en el ANEXO C.

Cebadores MY

El set de cebadores MY es uno de los sistemas de amplificación más frecuentes utilizados para detectar el VPH alrededor del mundo (64). Los cebadores MY (MY11, forward y MY09, reverse) tienen como blanco la región L1 generando un amplicón de 450pb y son capaces de detectar más de 18 genotipos (VPH 6, 11,

16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 52, 53, 55, 56, 58, 59 y otros) (64-66). La secuencia de los cebadores se encuentra en el ANEXO D.

Hybrid Capture 2 (HC2; Digene-Qiagen)

Este ensayo presenta alta sensibilidad para el diagnóstico del VPH en mujeres con NIC 2 o superior (67), detectando entre VPH de AR (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y de BR (VPH 6, 11, 42, 43 y 44) (16,68), pero sin la capacidad de detectar cada tipo individualmente (7). En la década pasada fue una de las herramientas más importantes para el diagnóstico del VPH, aunque continúa siendo ampliamente utilizada en el mundo (16,68). Es capaz de detectar ADNv en muestras de pacientes por medio de la hibridación de sondas de ARN (complementaria a la secuencia de cada genotipo), con señal de quimioluminiscencia (16,68,69). El ADNv es hibridado en solución con la sonda, formando un híbrido ADN-ARN (16). Los híbridos son capturados por anticuerpos pegados a las paredes de una microplaca que puede reconocer específicamente híbridos ADN-ARN (16). Estos híbridos que han sido inmovilizados son detectados por reacciones que generan luminiscencia medibles por un luminómetro (16). La prueba expresa sus resultados mediante unidades de luz relativa (RLUs, por sus siglas en inglés), que es calculado como el cociente entre la señal de la muestra y la señal media de los reactivos positivos (CO) del kit (69).

La intensidad de la señal es proporcional a la cantidad de virus presente en la muestra, dando una medición semicuantitativa de la carga viral (16). Las muestras son consideradas positivas cuando el cociente RLU/cutoff (CO) es 1.0 o mayor (16,69). Las muestras que presentan valores entre 1.0 a 2.5 deben ser reevaluadas para confirmar los resultados (69). Si el cociente es menor a 1.0, se debe reevaluar nuevamente la muestra y si los resultados continúan siendo menores a 1.0 se considera como negativo (69).

Cervista® HPV (Hologic, Inc.)

Es capaz de detectar 14 tipos del VPH de AR (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), sin genotipificarlos (7). Presenta una sensibilidad del 100% en detección de NIC 3 y del 98% en NIC 2, comparándolo con HC2 (7). Tiene una baja tasa de falsos-positivos y una alta especificidad y sensibilidad para detectar el VPH 16 y 18 (7).

INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics)

Es utilizado para monitorear infecciones persistentes del VPH (67), así como 28 diferentes genotipos, amplificado por PCR y seguido de hibridación reversa (70,71). Detecta los VPH de AR y de PAR (posible alto riesgo) (VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82) y de BR (VPH 6, 11, 40,

43, 44, 54, 69, 70, 71 y 74) (72). Utiliza un par de cebadores consensus llamados SPF, que generan un amplicón de 65pb de L1 y coamplifica un gen humano llamado HLA-DP1 de 270pb (7,16). Los amplicones son hibridados en tiras con oligonucleótidos específicos que han sido inmovilizados; la detección la realiza automáticamente el instrumento Auto-LiPA 48 (71).

Cobas 4800 HPV (Roche Diagnostic)

Es una técnica de qPCR que permite la detección de 12 tipos del VPH de AR y simultáneamente la genotipificación de los VPH 16 y VPH 18 (7,69,73). La amplificación y detección se realiza en una sola reacción mediante multiplex qPCR (7,73). En esta se utiliza cuatro fluoróforos diferentes: el primero para la detección de 12 VPH de AR (VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68): el segundo y tercero para la detección de los VPH 16 y 18 individualmente: y el cuarto para el control interno de *β-Globina* humana (7,73). Ha sido validada clínicamente para el diagnóstico del VPH de AR (7).

Abbott RealTime High Risk HPV (ART; Abbott Molecular)

Este ensayo es capaz de detectar 12 genotipos del VPH de AR (VPH 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) y al mismo tiempo tipificar el VPH 16 y VPH 18

(7,67,68); este ensayo puede ser utilizado para la detección primaria y el seguimiento para citologías anormales (67).

1.3.2. Ensayos para la genotipificación del VPH

PCR específica para genotipificar VPH

Se basa en el uso de cebadores diseñados específicamente para tipificar un genotipo determinado (2). Es un método laborioso, costoso y es usado en investigaciones iniciales (2).

PCR Human Papillomavirus Typing Set (Takara Bio Inc.)

Este ensayo utiliza cebadores que generan amplicones entre 228 y 268pb (74). Puede detectar los VPH 16, 18, 31, 33, 35, 52b y 58, así como los VPH de BR 6 y 11 (74). Para la genotipificación se lleva a cabo digiriendo con enzimas de restricción los productos de PCR y haciendo electroforesis (74).

IntelliPlex™ HPV DNA Genotyping

Este ensayo detecta 30 tipos del VPH (VPH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 66, 68, 70, 73, 81 (CP8304), 82,

y 83) (75). Utiliza una tecnología de perlas con código de barras para detectar los tipos del VPH de AR y BR en una sola reacción (75). Cada uno de los códigos de barra se encuentra unido a una sonda específica que en el momento de la PCR se biotiniza (75). Se hace una mezcla con estreptavidina-ficoeritrina para poder identificar los tipos del VPH por medio de fluorescencia (75).

CLART® human papillomavirus 2 (Genomica, S.A.U.)

Utiliza cebadores que amplifican un segmento de 450pb de L1 del VPH y utiliza como control interno el gen FTR, con un amplicón de 892pb (7). Los amplicones producidos son hibridados en un microarreglo y es capaz de detectar 35 tipos del VPH (VPH 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 68, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85 y 89), pudiendo así mismo generar resultados semicuantitativos (7).

Digene® HPV Genotyping LQ Test (Qiagen)

Los productos generados por la amplificación de una región de L1, son procesados por hibridación reversa (76). Utiliza sondas para detectar 18 VPH de AR (VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 (68a), 73 y 82 (IS39&MM4)) (77,78). Utiliza el Sistema Luminex 100 IS (Luminex Corporation) para generar sus resultados (77).

f-HPV typing™ kit (F-HPV)

Este ensayo permite el diagnóstico molecular, detectando y genotipificando 15 VPH (VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y un STR (Short Tandem Repeat) humano como control interno, en una sola reacción (76). Posee 15 cebadores que se hibridan a una región entre E6 y E7 (76). Utiliza cinco colorantes fluorescentes para el análisis automático de los fragmentos de ADN. Fue desarrollado para el instrumento Applied Biosystems ABI PRISM® (76).

PANArray HPV genotyping chip (Panagene)

Este chip inmoviliza 34 sondas PNA (*peptide nucleic acid*) específicas para la detección de 19 genotipos del VPH de AR (VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70 y 73) y de 13 de BR (VPH 6, 11, 32, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 62, 81 y 83). El control interno es el gen de β -Globina humana (79). Los cebadores generan un amplicón en la región L1 del VPH (79).

Linear Array genotyping HPV (Roche Molecular Systems)

Está basado en la utilización del sistema de amplificación PGMY09/11 (16). Comúnmente se lo requiere para monitorear la presencia de genotipos del VPH específicos (67). Mediante hibridación y genotipificación detecta 37 genotipos del

VPH, que incluye 13 de AR (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y 24 de BR (VPH 6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 y CP6108) (16,80).

PapilloCheck® (Greiner Bio One)

Permite la detección de 24 tipos del VPH (VPH 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82) en una reacción (7). Utiliza cebadores que genera un amplicón de 350pb de E1, junto a 28 sondas en un chip de ADN (7). Utiliza como control interno el gen humano ADAT1 (7). La hibridación es llevada a cabo en el chip de ADN y luego es detectada por un escáner de chip de ADN (7). Es capaz de detectar infecciones múltiples de tipos del VPH de AR y BR, pero aún presenta un costo elevado (7).

ANYPLEX™ II HPV28 DETECTION (H28) (Seegene Inc.)

Es un ensayo de qPCR capaz de detectar y genotipificar individualmente hasta 28 genotipos del VPH en dos reacciones (81). Este ensayo tiene el potencial de mejorar la genotipificación del VPH utilizando las tecnologías *Dual Priming Oligonucleotide* (DPO™), *Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension* (TOCE™) y el análisis semicuantitativo (Cyclic-CMTA) que se detallan a continuación:

Dual Priming Oligonucleotide (DPO™)

Es una tecnología que evita la amplificación no específica del ADN de interés, dando una alta especificidad y una confiable multiplex qPCR (81). El DPO es un cebador modificado que contiene dos segmentos que se hibridan al ADN de interés, separados entre sí por un enlazador de polydeoxyinosine «poly(I)» (81)(82). Deoxyinosine (I) es bien conocido por tener una baja temperatura de fusión, debido a débiles puentes de hidrógeno (81). Este enlazador poly (I) permite dividir al cebador DPO en dos segmentos perfectamente funcionales (81). El segmento del extremo 5' del cebador DPO es más largo (aproximadamente dos veces más largo) que del extremo 3'; por lo cual, las temperaturas de hibridación son diferentes (81).

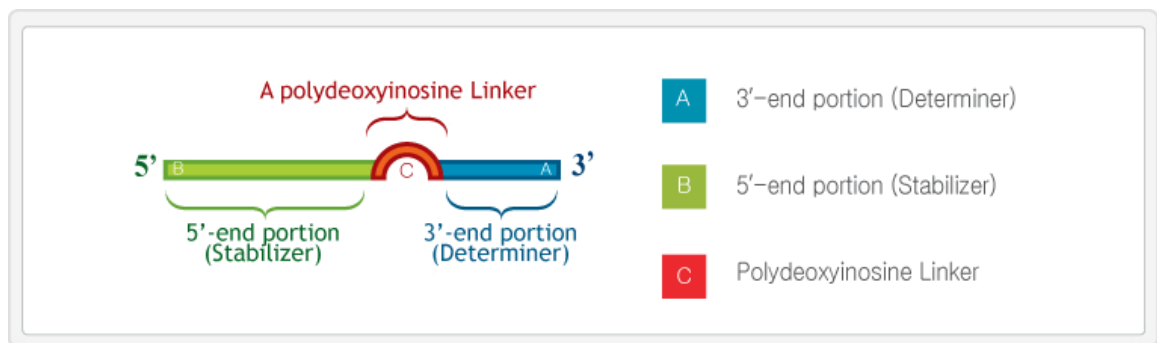


Figura 1.5. Esquema de la estructura de un DPO™
Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

El segmento 5' tendrá una mayor temperatura de hibridación y se anillará preferentemente primero durante la PCR (81). El segmento 5' estabilizará el cebador DPO, mientras que el segmento 3' es el que realiza la discriminación y

determina la especificidad del cebador DPO. La elongación se llevará a cabo solamente cuando el segmento 3' se hibride correctamente al ADN de interés (81). El segmento 3' al ser pequeño sólo puede hibridarse a la secuencia complementaria correcta, dando lugar a una gran especificidad entre secuencias similares o emparentadas.

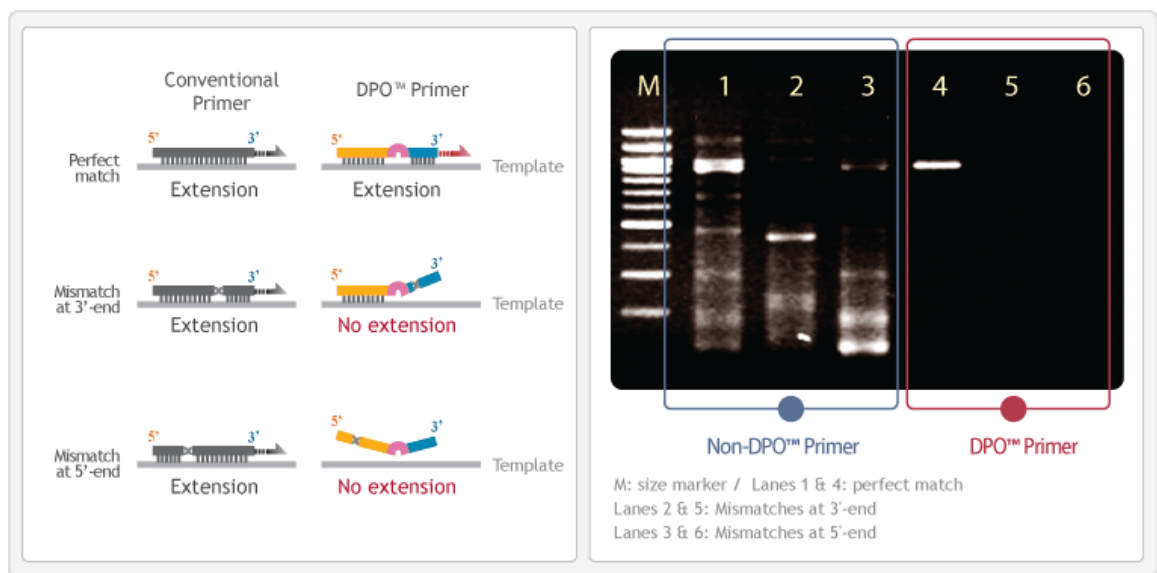


Figura 1.6. Ventajas del uso de un DPO™ versus cebadores normales
Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

La tecnología DPO presenta un mayor poder de discriminación de hasta un desoxirribonucleótido, dando mayor especificidad a la reacción de PCR. Los cebadores convencionales pueden hibridarse en secuencias no específicas, dando lugar a bandas inespecíficas.

Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension (TOCE™)

Esta tecnología permite la detección de múltiples ADNv de interés en un canal de un instrumento de qPCR por reacción, por medio de análisis de diferentes temperaturas de fusión de plantillas artificiales (el *catcher*) (83). Los componentes claves de la tecnología TOCE™ son el cebador específico DPO, el *pitcher* y el *catcher*. El cebador DPO provee una alta especificidad en la hibridación con la secuencia de interés. El *pitcher* es un cebador que presenta en su extremo 5' un segmento que no se hibrida al ADN de interés (porción de etiqueta) (83). El *catcher* es una plantilla artificial de tamaño y temperatura de fusión (T_m , por sus siglas en inglés) determinada; presenta un fluoróforo y un *quencher* que se encuentran juntos debido a la estructura del *catcher* (83).

La reacción comienza cuando los cebadores DPO y *pitcher* se hibridan al ADN, seguido, la ADN polimerasa con su actividad 5' - 3' exonucleasa libera la porción de etiqueta del *pitcher* (83).

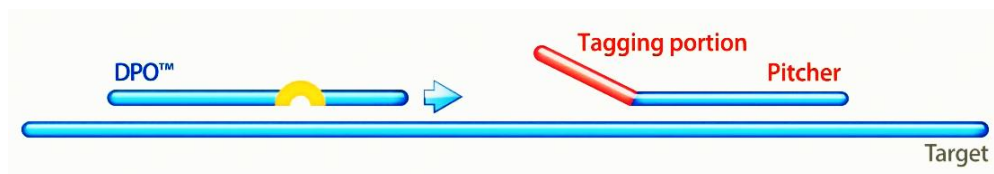


Figura 1.7. Esquema del funcionamiento de un DPO™ con el *pitcher*
Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

La etiqueta liberada se hibrida con el *catcher* mediante complementariedad de la secuencia.

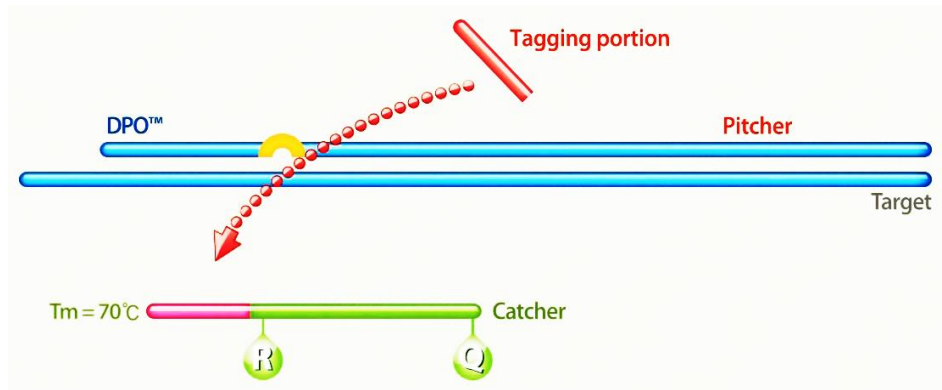


Figura 1.8. Funcionamiento del *pitcher* con su etiqueta (*tagging*) y el *catcher*
Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

Una vez hibridada la etiqueta en el *catcher* se produce la elongación, separando el fluoróforo del *quencher* y permitiendo la emisión de una señal.

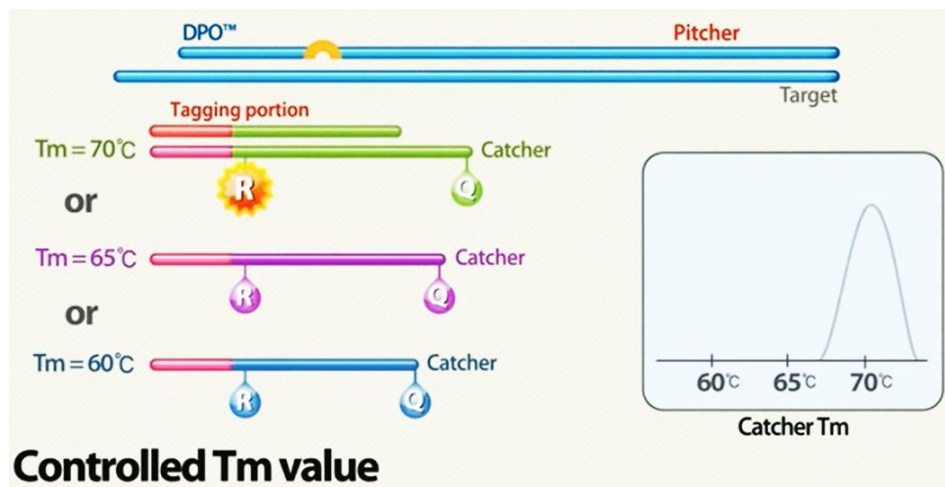


Figura 1.9. Funcionamiento de la etiqueta (*tagging*) junto al *catcher*
Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

En el kit utilizado cada genotipo del VPH consta de una etiqueta (*tagging*) distinta. Una etiqueta es capaz de hibridarse y elongar una secuencia marcada en particular. El kit posee varias etiquetas con sus respectivas secuencias marcadas y cada una de ellas posee una temperatura de fusión distinta. Esta particularidad permite hacer la distinción y detección de varios genotipos del VPH por medio de análisis de la T_m en un solo canal.

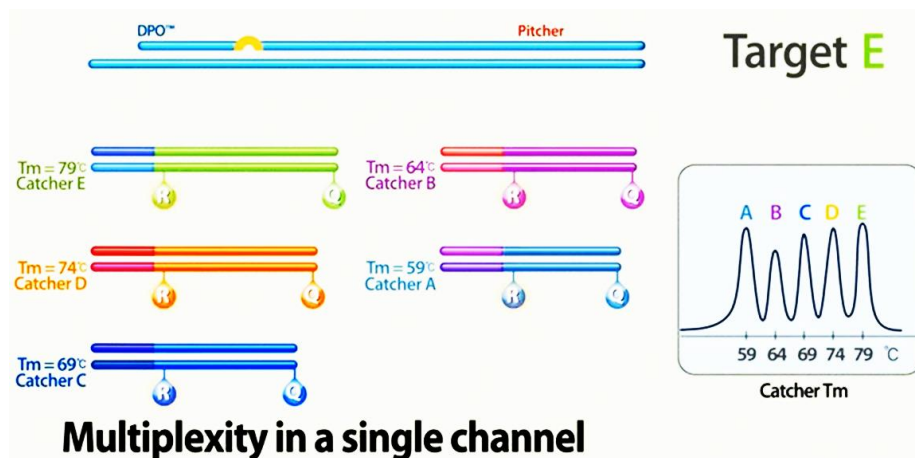


Figura 1.10. Esquema de capacidad multiplex para detectar varios blancos
Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

Análisis semicuantitativo (Cyclic-CMTA)

La temperatura de fusión (T_m) puede ser medida durante diferentes puntos o ciclos en la reacción de PCR (en los ciclos 25, 35 y 45), esto es llamado análisis cíclico de la temperatura de fusión del *catcher* (Cyclic-CMTA).

Cyclic Catcher Melting Temperature Analysis points

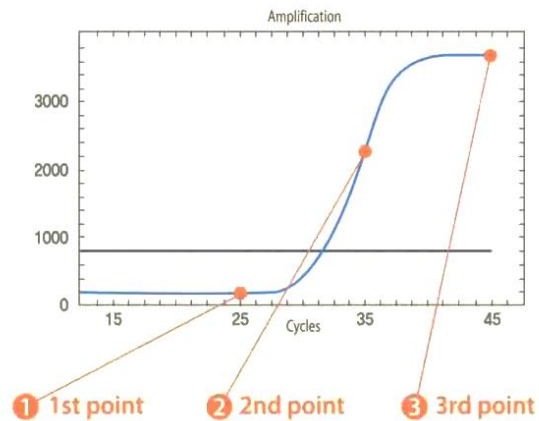


Figura 1.11. Esquema del análisis cíclico de la temperatura de fusión del *catcher* (Cyclic-CMTA)
Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

La cuantificación de los blancos es determinada por medio de los puntos cíclico-CMTA, basado en la concentración de un estándar.

Principle of quantitation by cyclic-CMTA

Samples	cyclic-CMTA points			Results (copies / assay)
	① 1st	② 2nd	③ 3rd	
Standard (copies / assay)	$>10^5$	$10^2 \sim 10^5$	$<10^2$	
A				$>10^5$
B				$10^2 \sim 10^5$
C				$<10^2$
D				Negative

Figura 1.12. Análisis semicuantitativo por medio del Cyclic-CMTA
Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

Tabla V. Capacidad de detección de diversos tipos del VPH por varios ensayos.

Ensayo	Genotipos detectados		Región blanco
	AR y ARP (posible AR) *según el fabricante	BR *según el fabricante	
Linear Array genotyping HPV (Roche)	VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68	VPH 6, 11, 26, 40, 42, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, IS39 y CP6108	L1 (PGMY09/11)
f-HPV typing™ kit (F-HPV)	VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68	VPH 6 y 11	E6 y E7
INNO-LiPA HPV Genotyping Extra (Innogenetics)	VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82	VPH 6, 11, 40, 43, 44, 54, 69, 70, 71 y 74	L1 (SPF10)
Digene HPV genotyping LQ test (Qiagen)	VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68 (68a), 73 y 82 (IS39&MM4)	-	L1 (GP5+/6+)
PANArray HPV genotyping chip (Panagene)	VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 70 y 73	VPH 6, 11, 32, 34, 40, 42, 43, 44, 54, 55, 62, 81 y 83	L1 (MY09/11, GP5+/6+)
PapilloCheck® (Greiner Bio One)	VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 y 82	VPH 6, 11, 40, 42, 43 y 44	E1
CLART® human papillomavirus 2 (Genomica, S.A.U.)	VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 72, 73, 82, 84, 85 y 89	VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 62, 70, 71, 81 y 83	L1
PCR Human Papillomavirus Typing Set (Takara)	VPH 16, 18, 31, 33, 35, 52b y 58	VPH 6 y 11	E6 y E7
Kit Anyplex™ II HPV28 Detection (Seegene)	VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 69, 73 y 82	VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 y 70	L1, E6 y E7
Secuenciamiento (<i>in-house</i>)	Todos	Todos	Depende de los cebadores usados

ENSAYO	INFORMACIÓN PROVISTA			SISTEMA DE PRUEBA	
	GENOTIPO	COINFECCIONES	ANÁLISIS CUANTITATIVO	HOMOGÉNEO	AUTOMATIZACIÓN
Hybrid capture	×	×	×	×	×
Real-time PCR	△	△	△	●	●
DNA Chip	●	●	×	×	×
DNA Sequencing	●	×	×	×	×
Anyplex™ II HPV28 Detection	●	●	●	●	●

Tabla VI. Comparación entre los diferentes ensayos para VPH
Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

1.3.3. Detección y pronóstico de progresión con biomarcadores

Aunque muchos ensayos permiten conocer la presencia del VPH desde etapas tempranas, solo una pequeña parte de las personas infectadas desarrollan cáncer (63). Para esto existen marcadores secundarios, que permiten identificar mujeres que presenten alto riesgo en el desarrollo de cáncer (63). Por medio de estas tecnologías el valor predictivo positivo aumenta y disminuye el exceso de gestión en lesiones de bajo grado (63). Por lo cual las nuevas investigaciones se enfocan en la búsqueda de estos marcadores como: la carga viral, expresión de ARNm (E6-E7), integración viral (E2/E6-7 cociente), variantes del VPH 16, ensayo inmunoenzimático de p16, perfil de metilación, ganancia en el componente de ARN de telomerasa humana (hTERC por sus siglas en inglés) y marcadores del ciclo y proliferación celular (63).

Expresión de E6 y E7 como método de progresión

Los tipos del VPH de AR están asociados a varios niveles de lesiones, también están presentes en mujeres con citología normal (63). Cuando existen lesiones de alto grado y desarrollo de cáncer, la expresión de E6 y E7 es alta (63). Este método se basa en la detección del ARNm de E6 y E7 por PCR con transcriptasa inversa y en tiempo real (RT-qPCR) (2,63). Este método permite determinar el nivel de expresión de estos ORFs transformantes (2). Y así la detección de los ARNm del VPH es más eficiente en la triada que el diagnóstico citológico (63).

PreTect HPV-Proofer (Proofer; Norchip AS)

Es un ensayo basado en la detección específica del ARNm de E6 y E7 de los VPH 16, 18, 31, 33 y 45 (84,85). El ensayo permite la detección y genotipificación en una sola reacción. Utiliza la amplificación basada en secuencias de ácidos nucleicos (NASBA, por sus siglas en inglés) y sondas con balizas molecular para la detección en qPCR (85).

APTIMA® HPV (Gen-Probe)

Este ensayo de diagnóstico *in vitro* permite conocer la presencia de los ARNm de E6 y E7 de 14 VPH de AR (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68) sin discriminar entre ellos (86).

NucliSENS EasyQ® HPV

Detecta igualmente los oncogenes activos (E6 y E7 ARNm) y puede discriminar entre los VPH 16, 18, 31, 33 y 45 (87,88). Recurre a las tecnologías PreTect® HPV-Proofer de NorChip y de amplificación NASBA® en tiempo real de bioMérieux (87).

HPV OncoTect™ E6, E7 mRNA (IncellIDx™, Inc.)

Es un ensayo para el diagnóstico cuantificación *in vitro* de los ARNm E6 y E7 de todos los tipos del VPH (89). Para la detección utiliza hibridación *in situ* y citometría de flujo (89). El diagnóstico se lleva a cabo en un solo tubo y consta de tres pasos: captura del blanco, amplificación mediada por transcripción (TMA, por sus siglas en inglés) y la detección de los productos de PCR por ensayo de protección de hibridación (HPA, por sus siglas en inglés) (86).

1.4. Variantes de los genotipos del VPH

Las variantes del VPH tienen propiedades importantes para el desarrollo de cáncer, tanto por las diferencias en su biología como en su química (2,90). Estas variantes pueden diferir en la patogenicidad del virus, a pesar de que se encuentran íntimamente relacionados filogenéticamente (17). Las variantes del VPH de AR pueden generar diferentes riesgos de desarrollo de cáncer y explica por qué algunas mujeres presentan infecciones persistentes y otras no (40). Estudios en filogenia han demostrado que el VPH 16 coevolucionó con las tres ramas filogenéticas de humanos que son la Africana, caucásica y asiática (91). Los estudios de variantes del VPH se han enfocado en el VPH 16, al encontrar alrededor de 5 ramas de variantes como:

Europea (E),

Asiática (As),

Asiática-Americana (AA),

Africana-1 (Af1) y

Africana-2 (Af2) (2,20,63,90).

Se ha detectado la aparición de una sexta variante llamada Norteamericana (NA) (20,63,90). Manteniendo aparentemente la variante Asiática-Americana (AA) mayor potencial oncogénico que la variante Europea (E) (2).

Las variantes encontradas del VPH se sugiere que están asociadas a la evolución y a la migración de los humanos (22,31).

Las variantes del VPH 16 y 18 conjuntamente forman un árbol filogenético con ramas que albergan variantes con alta presencia en cohortes de África, Europa o Asia oriental, con la rama de Asia oriental extendida a los nativos americanos (22).

Las variaciones genéticas del VPH 16 y 18 son comúnmente sustituciones, mientras que otros tipos presentan inserciones y deleciones; siendo éste un raro mecanismo de evolución del VPH (22). Recientes publicaciones revelan que puede ocurrir recombinación de las variantes del VPH, por medio de la recombinación homóloga o una infección con el mismo tipo del VPH, pero con una variante diferente (92). La región geográfica y el potencial oncogénico parecen estar relacionada a la distribución de las variantes del VPH (93). Los diferentes potenciales oncogénicos se asume que son producidos por cambios en la secuencia codificante y en los elementos de regulación en los VPH de AR (93). Aunque las funciones de los ORF del VPH son casi conocidos por completo, no se dispone de los mecanismos por los cuales las variantes del VPH de AR generan un aumento del potencial oncogénico (93).

1.4.1. Estudios de variantes del VPH de AR

Un estudio en España encontró que la variante predominante del VPH 18 es la Europea (56%), seguida de la Africana (23%) y en menor cantidad la Asiática-Americana (12%) y variantes recombinantes (92).

La prevalencia de las variantes del VPH en un estudio en Túnez, mostró que la variante Europea del VPH 16 representaba el 64% de las infecciones con VPH 16, mientras que todas las infecciones del VPH 18 fueron de la variante Europea (94). A la variante AA del VPH 16 se le atribuye el 25% del cáncer cervicouterino en México (95). Mientras que en Guanacaste, una provincia de Costa Rica, se encontró que la probabilidad de ser diagnosticada una mujer con cáncer cervicouterino es 11 veces más alta al tener una variante no Europea del VPH 16 (95). En el Ecuador, las variantes encontradas del VPH 16 fueron en un 85% la variante Europea y en un 15% la Africana (18).

Por medio de alineaciones de los genomas completos del VPH, empíricamente se definieron linajes y sublinajes de variantes, con diferencias entre 1,0 al 10,0% y 0,5 al 1,0% respectivamente (91,96). A partir de esto se dice que el VPH 16 presenta cuatro linajes (A, B, C y D) y de ocho a nueve sublinajes (91). Mientras que el VPH 31 presenta tres linajes (A, B y C) y siete sublinajes; el VPH 58 presenta cuatro linajes (A, B, C y D) y siete sublinajes (91,96); y el VPH 18 presentando tres linajes (A, B y C) y ocho sublinajes (96).

Estudios han mostrado que la variante Europea L83V, que presenta una sustitución en la posición 350 del ORF E6 llamada «E6-T350G» es un gran factor de riesgo en las personas que están infectada con ésta (63). Las detecciones de estas variantes han sido por secuenciamiento, pirosecuenciamiento y el análisis de fusión de alta resolución (HRM, por sus siglas en inglés) (63).

Especie	Tipo	Linaje	Sublinaje	ID variante del genoma	GeneBank (Aceso #)	Otros nombres*	
Alpha-9	HPV16	A	A1	Ref	K02718	European (E) European (E) E Asian, E(As) African-1, Afr1a African-1, Afr1b African-2, Afr2a North American (NA)1 Asian-American (AA)2 Asian-American (AA)1	
			A2	W0122	AF536179		
			A3	AS411	HQ644236		
			A4	W0724	AF534061		
		B	B1	W0236	AF536180		
			B2	Z109	HQ644298		
				R460	AF472509		
				QV00512	HQ644257		
		C		QV15321	AY686579		
				QV00995	AF402678		
	HPV31	A	A1	Ref	J04353		
			A2	IN221709	HQ537675		
			B1	QV03876	HQ537676		
		B	B2	QV17700	HQ537680		
				QV03136	HQ537682		
				QV14043	HQ537684		
		C		QV00693	HQ537685		
		HPV52	A	A1	Ref	X74481	
				A2	QV15145	HQ537739	
				B1	QV03594	HQ537740	
	B2			IN141070	HQ537743		
	B		C1	QV05867	HQ537744		
			C2	QV00615	HQ537746		
				QV02575	HQ537748		
	HPV58		A	A1	Ref	D90400	
				A2	QV15606	HQ537752	
				A3	QV00961	HQ537758	
				B1	BF134	HQ537762	
		B	B2	RW937	HQ537764		
				QV13816	HQ537774		
				QV03841	HQ537768		
			RW697	HQ537770			
Alpha-6		HPV53	A		Ref	X74482	A B B B B
					RW866	KF436818	
					QV28044	EF546477	
					QV31688	EF546482	
	D		D1	QV28877	KF436823		
			D2	TJ43	GQ472849		
			D3	QV22707	EF546479		
			D4				

Tabla VII. Varios tipos del VPH con sus linajes y sublinajes correspondientes.
Fuente: Burk, et al (2013).

CAPÍTULO 2:

MATERIALES Y MÉTODOS

La tesis fue realizada en el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), dentro del proyecto del SENESCYT PIC-12-INH-001 “Epidemiología Molecular del Virus de Papiloma Humano para la Prevención del Cáncer Cérvico – Uterino en mujeres de la Región Litoral del Ecuador”. Siendo éste aprobado por el Comité de Bioética Institucional del Hospital del Niño “Dr. Francisco de Ycaza Bustamante” (ANEXO E). La totalidad de esta tesis es realizada con nivel de bioseguridad dos.

2.1. Muestras y controles utilizados

Las muestras utilizadas para este estudio provinieron de las provincias de Esmeraldas, Manabí, Los Ríos, Santa Elena, Guayas y El Oro. Un total de 192 muestras fueron codificadas por el INSPI y luego evaluadas para el diagnóstico del VPH. Estas muestras fueron de mujeres con citología NIC 1, 2 y 3, y con criterio de inclusión de ser mayores de 30 años de edad. Para la toma de muestras se utilizó Cobas® PCR Cell Collection Media (Roche Molecular Systems), siguiendo el personal médico el protocolo del fabricante (ver ANEXO F) y se almacenó a -20°C hasta la extracción del ADN.

El proceso de clonación de controles positivos (VPH y *β-globina*) utilizó el plásmido de transporte pGEM-T easy vector (Promega) y células competentes DH5α (Invitrogen™), siendo provistos y realizado gracias al apoyo del Laboratorio de Biomedicina de ESPOL (protocolo en el ANEXO G).

2.2. Extracción del ADN

El proceso de extracción utilizó el QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), siguiendo el protocolo (ver ANEXO H) recomendado por el fabricante. El ADN fue resuspendido en 100 µL de Buffer AE (QIAamp DNA Mini Kit). Se cuantificó y evaluó la calidad del ADN de todas las muestras, mediante el uso del

espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) cordialmente provisto por el Instituto de Biomedicina de la Universidad Católica de Santiago de Guayaquil (UCSG) y se almacenó a -80°C .

2.3. Ensayo con cebadores MY y secuenciamiento con Sanger

2.3.1. Cebadores MY

Se utilizó los cebadores degenerados MY11-MY09 descritos (ver ANEXO D) (Roche) para el diagnóstico del VPH. Estos cebadores generan un amplicón de 450pb (65,66).

2.3.2. Cebadores del control interno

El control interno de *β -globina* humana utilizó los cebadores 5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3' (PC03; forward) y 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' (PC04; reverse) (Invitrogen™) (ver ANEXO D) (65)(97). Estos cebadores generan un amplicón de 110pb.

2.3.3. Diagnóstico molecular del virus

Para el proceso de diagnóstico molecular y detección de *β -globina*, se realizó la PCR con los sets de cebadores MY09/11 y PC03-PC04 para cada

muestra independientemente. Bajo las condiciones de PCR mostradas en el ANEXO I. La cantidad de ADN total utilizada para cada reacción de PCR fue de alrededor de 100 ng, aumentando la concentración en casos que lo ameriten. Los productos de PCR (junto con controles positivos y negativos) se revelaron en un gel de agarosa al 2% y tratados con SYBR® Safe (Life Technologies). Los casos posibles en los resultados se muestran en la Tabla VIII.

Casos posibles	Amplificación		Resultado de la prueba
	CI (β -Globina)	Blanco (VPH)	
Caso uno	Si	No	VPH no detectable
Caso dos	Si	Si	VPH detectable
Caso tres	No	Si	Repetir prueba

Tabla VIII. Posibles casos que pueden ocurrir en una PCR

Una vez que el diagnóstico molecular se llevó a cabo, se procede a realizar el corte de las bandas de los amplicones del VPH y su purificación con el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) con el protocolo del fabricante disponible en internet.

Los productos ya purificados fueron analizados su pureza y concentración de ADN con la ayuda del espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) de la ESPOL.

2.3.4. Secuenciamiento con el método de Sanger

Los productos purificados fueron enviados a secuenciar a la empresa Genewiz Inc. que utiliza los analizadores de ADN ABI 3730xl (Applied Biosystems) para la electroforesis capilar y la detección de terminadores con colorantes fluorescentes (98). Cada muestra fue enviada en dos tubos para el secuenciamiento en las dos direcciones y, de este modo, poder recuperar un mayor segmento de la secuencia de cada genotipo por medio del ensamblaje de éstas. Este método genera la secuencia de tipo del VPH que se encuentre o, el que se encuentre en mayor proporción (mayor carga viral) en el caso de infecciones múltiples.

2.3.5. Análisis bioinformáticos

Estos análisis se los realizó con las secuencias de los cromatogramas entregadas por Genewiz Inc. Estos cromatogramas vienen en formato *.ab1 y para su análisis se utilizó el programa *Geneious 6*. Una vez limpia la secuencia, es analizada mediante el uso de *Blast (Basic Local Alignment Search Tool)* del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés). La herramienta *Blast* nos permite encontrar secuencias similares a las ingresadas a la búsqueda. Esta búsqueda da como resultado un tipo del VPH que

corresponde a la secuencia ingresada a *Blast* y de esta manera nos permite conocer el tipo del VPH encontrado en el secuenciamiento.

2.4. Ensayo con el kit Anyplex II HPV28

Para este ensayo se utilizó el sistema para qPCR CFX96™ C1000 (Bio-Rad), provisto por la empresa SIMED y se siguió el protocolo del fabricante en (99).

2.4.1. Diagnóstico molecular del virus

Para este diagnóstico se utilizaron las muestras que dieron positivas para VPH con los cebadores MY. Los reactivos necesarios y controles son provistos en el kit. El diagnóstico molecular de los 28 tipos del VPH se lleva a cabo en dos reacciones por muestra. Cada reacción lleva un set de cebadores llamados «TOCE Oligo Mix (TOM)» y denotados como *A TOM* y *B TOM*. El *A TOM* es capaz de detectar 14 tipos del VPH de AR (VPH 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68), mientras que el *B TOM* detecta cinco VPH de AR (VPH 26, 53, 69, 73 y 82) y nueve de BR (VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61 y 70) (99). En cada reacción se utilizó los siguientes componentes mostrados en la Tabla IX.

Componente	Volumen (μL)
4X HPV28 A TOM o B TOM	5
4X Anyplex PCR Master Mix (con UDG)	5
Agua ultrapura	5
Muestra	5
Total de volumen de la reacción	20

Tabla IX. Componentes de cada reacción.
Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

Para los controles se ocupó:

Control negativo: Agua ultrapura libre de ARNasa.

Control positivo: Los tubos PC1, PC2 y PC3, de cada uno de los dos set de TOM (TOM A y TOM B).

Para el desarrollo de la técnica se utiliza el Sistema de qPCR CFX-96 (Bio-Rad).

Una vez que las reacciones estén hechas y posicionadas adecuadamente, se configura el protocolo de ciclado (Tabla X), protocolo de la placa y se ejecuta la corrida.

Segment	No. of cycles	Temperature	Duration
1	1	50°C	4 min
2	1	95°C	15 min
3		95°C	30 sec
4	30	60°C	1 min
5		72°C	30 sec
6	1	55°C	30 sec
7*	1	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)	
8		95°C	30 sec
9	10	60°C	1 min
10		72°C	30 sec
11	1	55°C	30 sec
12*	1	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)	
13		95°C	30 sec
14	10	60°C	1 min
15		72°C	30 sec
16	1	55°C	30 sec
17*	1	Melting curve 55°C ~ 85°C (5 s / 0.5°C)	

Tabla X. Ciclado que determina el fabricante.

Fuente: Seegene Inc. (Seoul)

Una vez finalizada la corrida se archiva los resultados en una carpeta específica y se generan los resultados.

2.5. Análisis de datos

Los datos de los genotipos obtenidos por medio del secuenciamiento y del kit Anyplex II HPV28 fueron tabulados con Microsoft Excel 2013 y analizados con Epi Info™ 7.1.5.0. Los análisis estadísticos de Spearman fueron realizados con la aplicación en línea de *Social Science Statistics*.

2.6. Filogenia

Análisis filogenéticos fueron realizados a partir de las secuencias del VPH16 y 58 que presentaban gran calidad, obtenidas por secuenciamiento. Los árboles filogenéticos fueron realizados en Geneious 6.0.6 con el método de *Neighbor-joining* con 1.000 réplicas y el modelo de parámetro *Tamura-Nei*. Para la realización del árbol del VPH 16 se utilizaron 34 secuencias y, para el VPH 58 se utilizaron 17 secuencias con una calidad del 100%. *Neighbor-joining* es un método heurístico para la estimación de un árbol de evolución mínima (ME, por sus siglas en inglés) a partir de datos distancia evolutiva (110,101). Este método dispone la velocidad de cálculo con la singularidad de los resultados y, es el método más usado para la construcción de árboles de distancia (100).

CAPÍTULO 3:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Resultados

3.1.1. Diagnóstico molecular del VPH

De las 192 muestras iniciales, 158 (82.29%) dieron positivas para VPH. Estas 158 muestras fueron utilizadas para el secuenciamiento y el ensayo con el kit Anyplex II HPV28.

3.1.2. Secuenciamiento

El secuenciamiento no pudo detectar tipo alguno de VPH en siete muestras (4.43%), debido al solapamiento de las secuencias en el cromatograma (varios tipos de VPH en alta carga viral) o errores en la preparación de las muestras a secuenciar. Se pudieron detectar hasta cinco casos de infecciones dobles, debido a que se utilizó cebadores *forward* y *reverse* en tubos independientes por cada muestra; por lo cual, cada una de las reacciones pudo dar un genotipo prevalente diferente. La figura 3.1 muestra la frecuencia de los genotipos del VPH encontrados en el secuenciamiento, mostrando mayor prevalencia el VPH 16 (40,38%), VPH 58 (18,59%), VPH 53 (5,77%), VPH 52 (3,85%) y VPH 31 (3,85%).

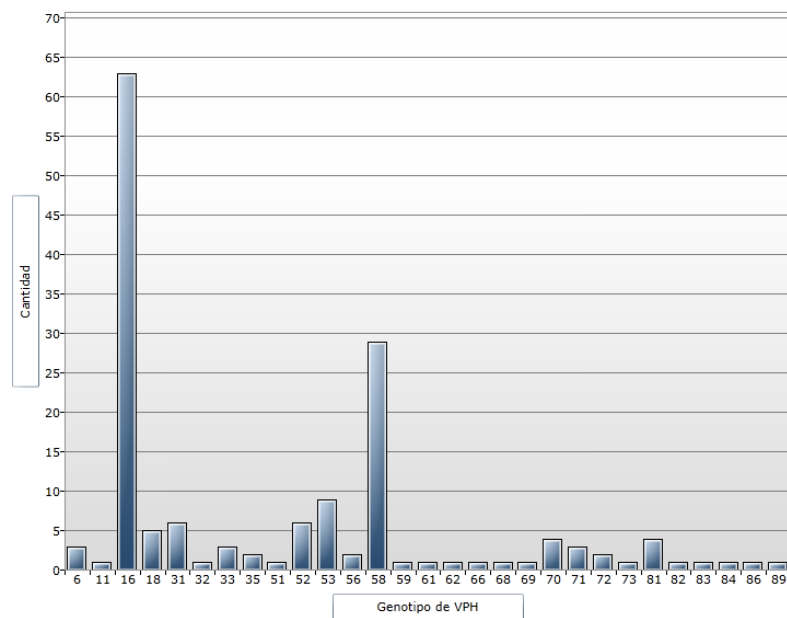


Figura 3.1 Frecuencia de los tipos del VPH totales encontrados por secuenciamiento (Epi Info™ 7).

VPH tipo
31 y 33
16 y 59
62 y 89
16 y 58
52 y 81

Tabla XI. Infecciones dobles encontradas con el secuenciamiento (Epi Info™ 7).

3.1.3. Anyplex II HPV28 (H28)

La frecuencia de los genotipos encontrados con el kit es mostrada en la figura 3.2; mostrando mayor prevalencia el VPH 58 (22,31%), VPH 70 (13,68%), VPH 16 (10,91%), VPH 53 (8,63%) y VPH 35 (7,49%).

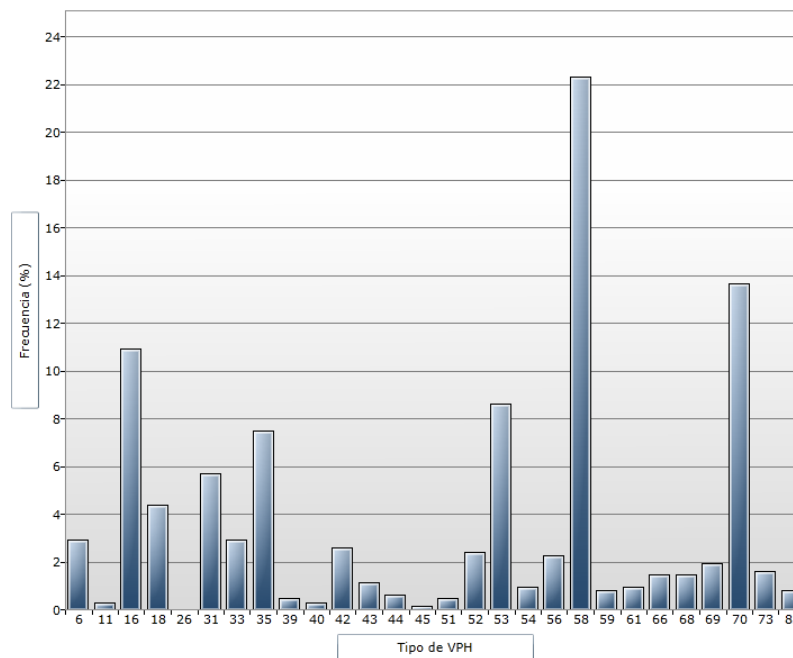


Figura 3.2. Frecuencia de genotipos totales encontrados con el kit Anyplex II HPV28 (Epi Info™ 7).

H28 fue capaz de detectar uno o varios tipos del VPH en todas las 158 muestras analizadas. Las monoinfecciones y coinfecciones fueron de 5.06% y 94.94% respectivamente.

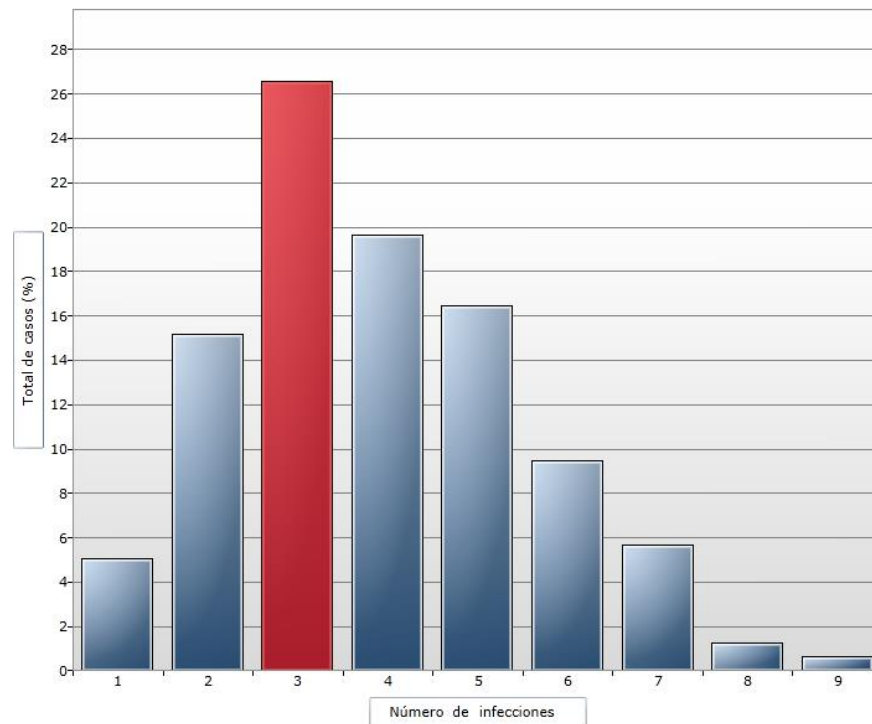


Figura 3.3 Frecuencia de monoinfecciones y coinfecciones encontradas con Anyplex II HPV28. En rojo se muestra el número de coinfecciones de mayor prevalencia.

3.1.4. Comparación entre los dos ensayos

De las 158 muestras positivas, 19 (12.02%) fueron excluidas del análisis. De estas 19 muestras, 12 (7.59%) fueron excluidas debido a que el genotipo encontrado por secuenciamiento no era detectado por H28 y/o puede haber coinfecciones que no son posibles establecer los genotipos por secuenciamiento;

y siete muestras (4.43%) corresponden al solapamiento de las secuencias o errores de secuenciamiento (haciendo imposible identificar el tipo presente). Los tipos encontrados por secuenciamiento y que no puede detectar H28 fueron el VPH 32, 62, 71, 72, 81, 83, 84, 86 y 89.

Conociendo que H28 fue capaz de genotipificar coinfecciones en forma semicuantitativa, se dispuso a comparar el genotipo que presentaba mayor carga viral por H28 con el genotipo encontrado por secuenciamiento. Además, se comparó todos los genotipos encontrados en coinfecciones por H28 con el genotipo encontrado en secuenciamiento. De las 139 muestras aptas para la comparación, los genotipos totales de coinfecciones encontrados por H28 y secuenciamiento fue diferente en 20 (14.39%) muestras.

La concordancia entre el genotipo encontrado por secuenciamiento y el genotipo encontrado en mayor carga viral (primera curva de fusión) en H28 fue de 89 muestras (64%), (Spearman $\rho=0.5615$; $p<0.0001$); mientras que, con la primera y segunda curva de fusión (todos los tipos encontrados en coinfecciones) fue de 119 muestras (85.6%), (Spearman $\rho=0.8147$; $p<0.0001$). Estos valores del coeficiente de correlación de Spearman dan una moderada ($\rho >0.5$) y fuerte ($\rho >0.75$) correlación positiva respectivamente.

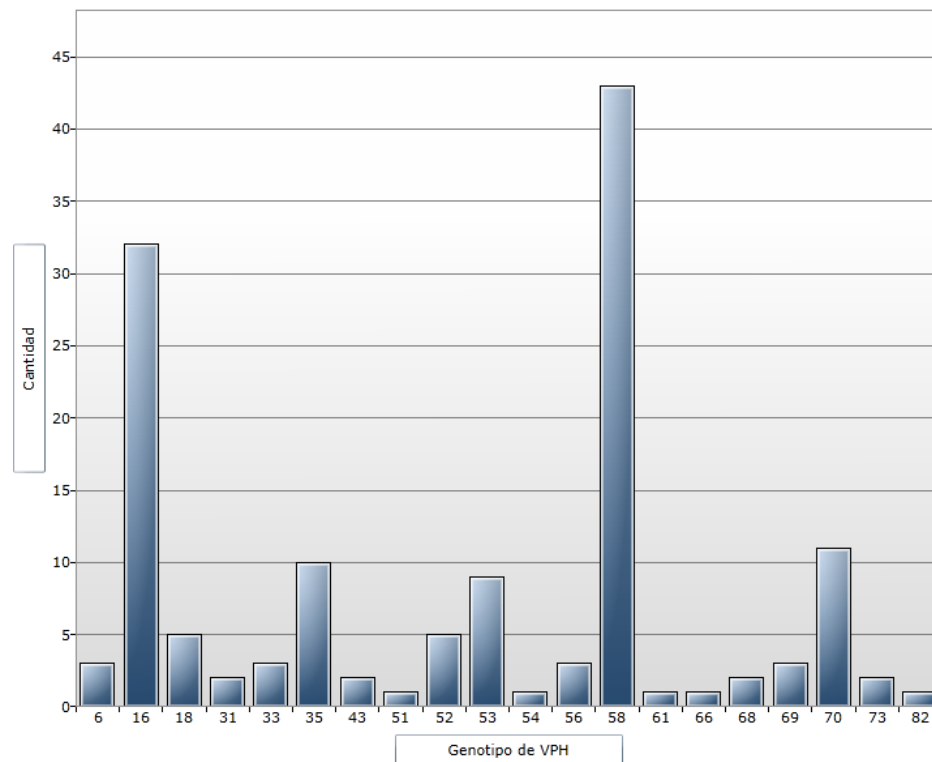


Figura 3.4. Frecuencia de genotipos encontrados con el kit Anyplex II HPV28 en la primera curva de fusión.

3.1.5. Análisis filogenético del VPH 16 y 58

Las relaciones evolutivas entre genes y organismos pueden ser ilustradas usando la filogenia (100). Los árboles filogenéticos son los diagramas utilizados para representar estas relaciones (100). Y son una herramienta para el mejor entendimiento de un problema evolutivo en particular (102). Para este estudio un árbol filogenético representa la relación de secuencias de genes con sus secuencias ancestrales.

Para armar el árbol filogenético del VPH 16 y 58, se utilizaron 34 secuencias del VPH 16 y 17 secuencias del VPH 58 respectivamente y se compararon a secuencias de referencias citadas por Burk, et al (2013). Estas secuencias presentaban gran calidad en el cromatograma, por lo que fueron incluidas en este análisis. Para poder desarrollar un buen árbol filogenético se excluyeron secuencias que aunque permitían conocer el genotipo de VPH, no presentaban buena calidad en su cromatograma para este análisis.

Análisis filogenético del VPH 16

Los análisis filogenéticos mostraron que 27 muestras (79.4%) pertenecen al linaje A del VPH 16; no se encontraron muestras que presenten el linaje B ni del linaje C; siete muestras (20.6%) pertenecieron al linaje D. De las siete muestras del linaje D, cuatro pertenecen al sublinaje Asiático-Americano 1 (AA 1) y tres muestras al sublinaje Asiático Americano 2 (AA 2).

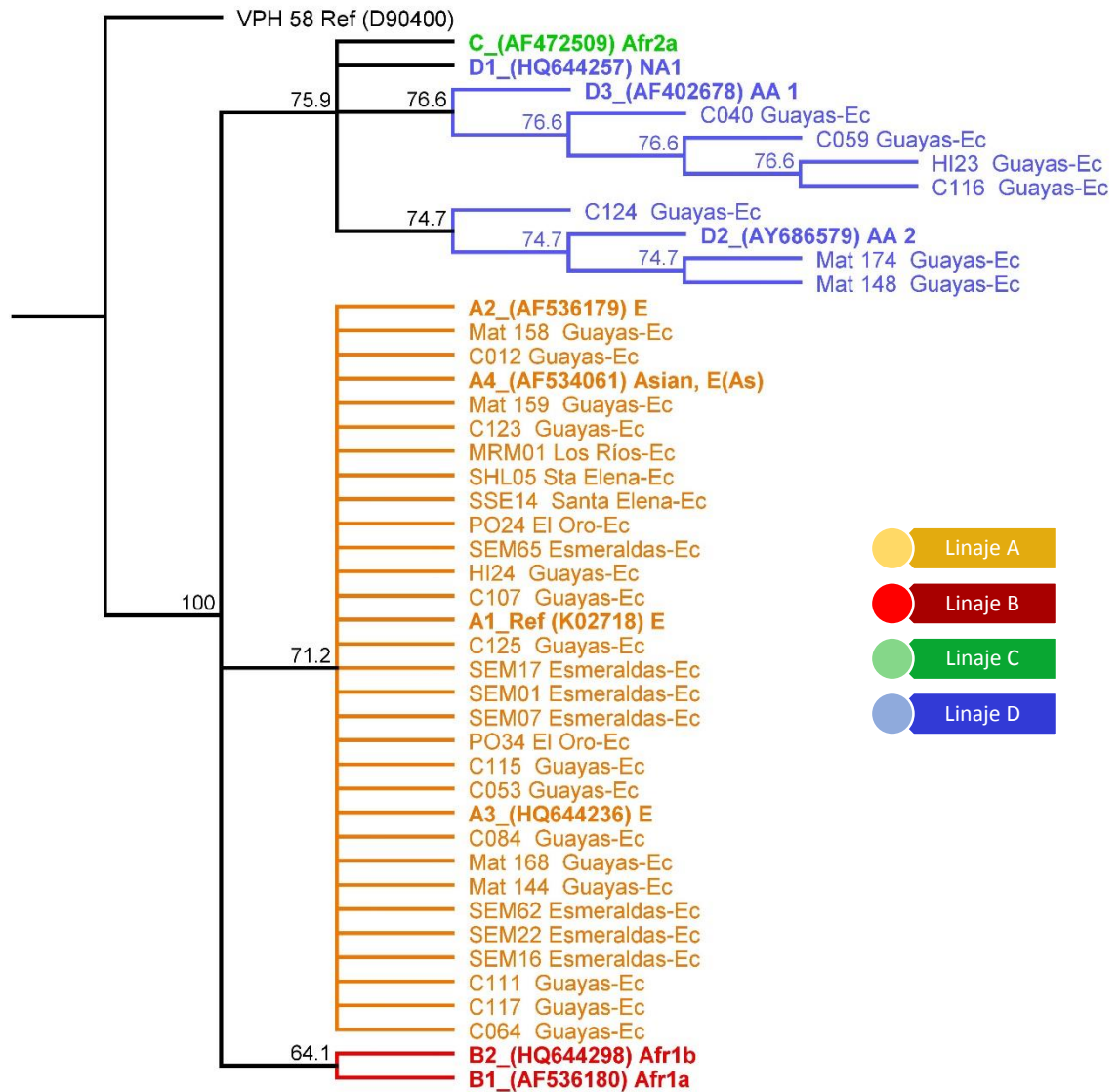


Figura 3.5. Árbol filogenético de *Neighbour joining* basado en las variantes del VPH 16 con 367pb de L1 (MY09/11). Se utilizó el modelo *Tamura-Nei*, con 1.000 *Bootstrap* rep y *threshold* 60%. (E) Europea, E (As) Este de Asia, (Afr) Africana, (NA) Norteamericana y (AA) Asiática Americana. *Geneious* 6.0.6.

Análisis filogenético del VPH 58

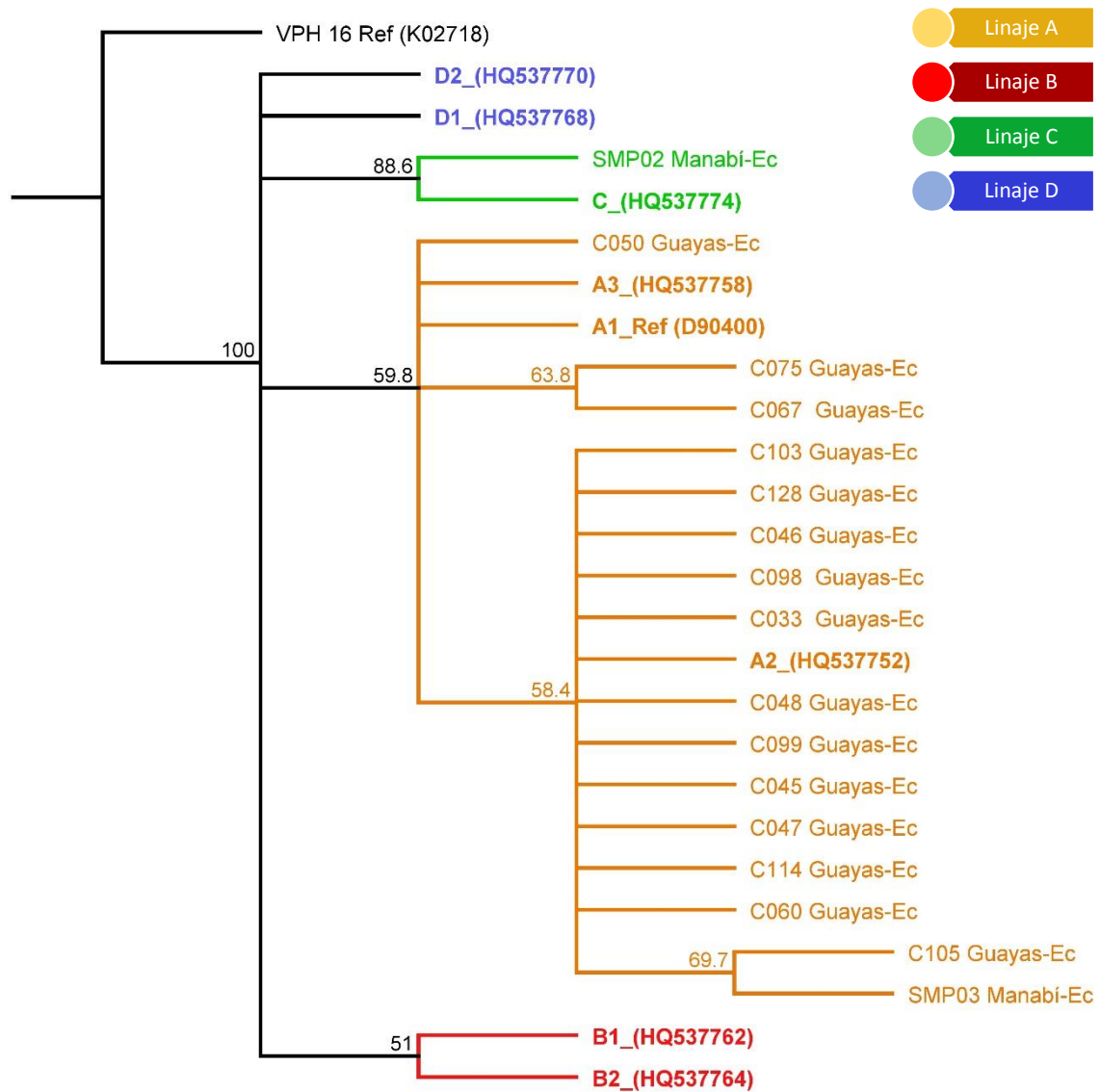


Figura 3.6. Árbol filogenético de *Neighbor joining* basado en las variantes del VPH 58 y referencias con 371pb de L1 (MY09/11). Se utilizó el modelo *Tamura-Nei*, con 1.000 *Bootstrap* rep y *threshold* 50%. *Geneious* 6.0.6.

El análisis del árbol filogenético del VPH 58 mostró que, 16 de las 17 muestras analizadas pertenecen al linaje A del VPH 58; de éstas, 13 muestras con el linaje A2 y tres sin relacionarse a los sublinajes de referencia. Solo una muestra perteneció al linaje C. Ninguna muestra perteneció a los linajes B ni D.

3.2. Discusión

Los ensayos moleculares con su alta sensibilidad son capaces de detectar diferentes genotipos del VPH, permitiendo que a lo largo del tiempo puedan ser mejorados en su especificidad. La presente tesis buscó evaluar la genotipificación de H28 comparándolo con el secuenciamiento con Sanger y la amplificación con cebadores MY que son ampliamente utilizados.

La diferencia en los resultados obtenidos entre los dos ensayos se explica a la elevada especificidad de los DPO, en comparación con los cebadores MY que contienen nucleótidos degenerados y que son normalmente usados para la detección y estudio de la historia natural del VPH (103). Los cebadores MY han mostrado irregularidad al hibridarse en los VPH 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 52, 53, 55 y 56, y puede desencadenar una amplificación deficiente (65). Según Speich *et al* (2004), los cebadores MY no son capaces de amplificar los VPH 51 y 59, pero el secuenciamiento pudo genotipificar a ambos genotipos en este estudio. Aunque los cebadores MY no están diseñados para detectar los VPH

43, 44 y 54, el kit H28 fue capaz de diagnosticar en el presente estudio (64,65). Sin embargo, sus frecuencias fueron bajas y pudieron influir en las diferencias observadas en los resultados. Utilizar otros cebadores o modificaciones de éstos (e.g. PGMY), permitirían mejorar la detección y posterior genotipificación en el secuenciamiento (66). Los continuos descongelamientos a los que son sometidas las muestras, pueden llevar al caso de la pérdida del genoma viral, explicando así parte de las diferencias en la genotipificación (103). Los resultados obtenidos entre la comparación del secuenciamiento con la primera curva de fusión del kit (64% de concordancia; Spearman $\rho=0.5615$; $p<0.0001$), y luego el incremento de la correlación con los genotipos totales de coinfecciones encontrados por el kit (85.6% de concordancia; Spearman $\rho=0.8147$; $p<0.0001$), señalan la presencia de cargas virales altas en coinfecciones y preferencias en la amplificación de ciertos tipos de VPH por parte de los cebadores (104). Los valores de correlación de Spearman (moderada; $\rho>0.5$) y fuerte ($\rho >0.75$) correlación positiva, muestran claramente que no necesariamente el genotipo que se encuentra en alta prevalencia en H28, es genotipificado por el secuenciamiento.

Sumando ambos ensayos, se pudo genotipificar un total de 36 tipos diferentes de VPH. En el secuenciamiento los tipos encontrados en mayor frecuencia fueron el VPH 16 (40,38%), VPH 58 (18,59%), VPH 53 (5,77%), VPH 52 (3,85%) y VPH 31 (3,85%). El kit H28 dio una frecuencia de VPH 58 (22,31%), VPH 70 (13,68%),

VPH 16 (10,91%), VPH 53 (8,63%) y VPH 35 (7,49%). La diferencia en las frecuencias encontradas de los tipos del VPH por ambos ensayos, muestran que existe preferencia por parte de los cebadores en amplificar un tipo del VPH específico (104). Tomando en cuenta que en Colombia los genotipos más frecuentes son el VPH 16, 18, 31, 33, 45 y 58, y en Perú son el VPH 16, 18, 31, 52 y 35 (105), Ecuador presenta un panorama muy diferente en las frecuencias y en la prevalencia particular del VPH 58, esto puede deberse a fluctuaciones aleatorias, falta de representatividad de las muestras o variaciones en la sensibilidad de los ensayos usados (106).

Aunque el secuenciamiento no permite conocer coinfecciones (raramente infecciones dobles), si permite conocer la presencia de tipos del VPH que no son evaluados por el kit. Aunque se pudo observar cinco infecciones dobles en el secuenciamiento, el uso del kit nos permite ampliar nuestro campo de apreciación de infecciones múltiples o coinfecciones. Es así que el kit mostró niveles de coinfecciones del 95%, frente a los escasos cinco casos (3%) de infecciones dobles mostradas en el secuenciamiento. Otro estudio hecho con H28 en Suiza, encontró un 42% de coinfecciones (107).

Los análisis filogenéticos del VPH 16 mostraron que el linaje A, con su variante Europea, está presente en 4/5 de las secuencias analizadas; mientras que el resto de las secuencias pertenecen al linaje D y a su variante Asiática-Americana, que

se caracteriza por tener un potencial oncogénico mayor que la variante Europea (2). Comparando los resultados obtenidos, con los resultados de Tornesello *et al* (2008)(85% la Europea y 15% la Africana), se observa que la variante Europea es predominante.

En el árbol filogenético del VPH 58 sólo una secuencia perteneció al linaje C. La mayoría (16 de las 17 secuencias analizadas) se agrupó con el linaje A. Siendo 13 secuencias del linaje A2 y tres sin relacionarse a los sublinajes de referencia. Estas tres secuencias que no tienen relación con los sublinajes de referencias, puede deberse a recombinaciones entre variantes de VPH que no permitieron agrupar correctamente los sublinajes del VPH58 o al tamaño de las secuencias. Esto aporta la primera información en cuanto a los linajes y sublinajes del VPH 58 presentes en Ecuador.

CAPÍTULO 4:

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- Aunque el secuenciamiento con Sanger es comúnmente utilizado para estudios del VPH, el kit Anyplex II HPV28 con su tecnología permite la genotipificación inclusive en coinfecciones numerosas donde el secuenciamiento es ineficaz.
- La probabilidad de desarrollar cáncer cervicouterino aumenta al existir coinfecciones, por lo cual, el ensayo Anyplex II HPV28 es un instrumento valioso para ello.
- Este estudio proporciona información sobre cómo mejorar la genotipificación y el panorama epidemiológico de las coinfecciones, mediante la evaluación de H28.
- Se pudo evidenciar las variantes circulantes del VPH 16 y 58 en la población estudiada, proporcionando así información que no se tenía en Ecuador. El 20% de las variantes del VPH 16 encontradas perteneció a una variante agresiva llamada Asiática Americana (AA).

4.2. Recomendaciones

- Estudios de mayor amplitud, debe llevarse a cabo. De esta manera se puede conocer con certeza la magnitud de infecciones con VPH presentes en la población ecuatoriana y los diferentes genotipos y variantes circulantes.
- Los siguientes estudios deben de evaluar el uso de otros ORF del VPH, utilizar el genoma completo; reevaluar o comparar el secuenciamiento por medio de la utilización de otros cebadores como los PGMY, GP5+/6+, etc.
- La implementación de la vacunación universal a niñas y mujeres en Ecuador, debe de tomar en cuenta los genotipos que están presentes en la población femenina ecuatoriana y su prevalencia.
- Mayores estudios de las variantes presentes del VPH 16 y 58 deben de llevarse a cabo, debido al mayor potencial oncogénico que pueden presentar algunas de sus variantes.

ANEXOS

ANEXO A

Representación taxonómica de la familia *Papillomaviridae*

Fuente: ICTV.

Familia	Género (39 en total)	Especie	Tipos del VPH
<i>Papillomaviridae</i>	<i>Alphapapillomavirus</i>	<i>Alphapapillomavirus 1</i> <i>Alphapapillomavirus 2</i> <i>Alphapapillomavirus 3</i> <i>Alphapapillomavirus 4</i> <i>Alphapapillomavirus 5</i> <i>Alphapapillomavirus 6</i> <i>Alphapapillomavirus 7</i> <i>Alphapapillomavirus 8</i> <i>Alphapapillomavirus 9</i> <i>Alphapapillomavirus 10</i> <i>Alphapapillomavirus 11</i> <i>Alphapapillomavirus 12</i> <i>Alphapapillomavirus 13</i> <i>Alphapapillomavirus 14</i>	65 tipos
	<i>Betapapillomavirus</i>	<i>Betapapillomavirus 1</i> <i>Betapapillomavirus 2</i> <i>Betapapillomavirus 3</i> <i>Betapapillomavirus 4</i> <i>Betapapillomavirus 5</i> <i>Betapapillomavirus 6</i>	51 tipos
	<i>Chipapillomavirus</i>	<i>Chipapillomavirus 1</i> <i>Chipapillomavirus 2</i> <i>Chipapillomavirus 3</i>	
	<i>Deltapapillomavirus</i>	<i>Deltapapillomavirus 1</i> <i>Deltapapillomavirus 2</i> <i>Deltapapillomavirus 3</i> <i>Deltapapillomavirus 4</i> <i>Deltapapillomavirus 5</i>	

	<i>Deltapapillomavirus 6</i>	
<i>Dyodeltapapillomavirus</i>	<i>Dyodeltapapillomavirus 1</i>	
<i>Dyoepsilonpapillomavirus</i>	<i>Dyoepsilonpapillomavirus 1</i>	
<i>Dyoetapapillomavirus</i>	<i>Dyoetapapillomavirus 1</i>	
<i>Dyoiotapapillomavirus</i>	<i>Dyoiotapapillomavirus 1</i> <i>Dyoiotapapillomavirus 2</i>	
<i>Dyokappapapillomavirus</i>	<i>Dyokappapapillomavirus 1</i>	
<i>Dyolambdapapillomavirus</i>	<i>Dyolambdapapillomavirus 1</i>	
<i>Dyomupapillomavirus</i>	<i>Dyomupapillomavirus 1</i>	
<i>Dyonupapillomavirus</i>	<i>Dyonupapillomavirus 1</i>	
<i>Dyoomikronpapillomavirus</i>	<i>Dyoomikronpapillomavirus 1</i>	
<i>Dyopipapillomavirus</i>	<i>Dyopipapillomavirus 1</i>	
<i>Dyorhopapillomavirus</i>	<i>Dyorhopapillomavirus 1</i>	
<i>Dyosigmapapillomavirus</i>	<i>Dyosigmapapillomavirus 1</i>	
<i>Dyothetapapillomavirus</i>	<i>Dyothetapapillomavirus 1</i>	
<i>Dyoxipapillomavirus</i>	<i>Dyoxipapillomavirus 1</i>	
<i>Dyozetapapillomavirus</i>	<i>Dyozetapapillomavirus 1</i>	
<i>Epsilonpapillomavirus</i>	<i>Epsilonpapillomavirus 1</i>	
<i>Etapapillomavirus</i>	<i>Etapapillomavirus 1</i>	
<i>Gammapapillomavirus</i>	<i>Gammapapillomavirus 1</i> <i>Gammapapillomavirus 2</i> <i>Gammapapillomavirus 3</i> <i>Gammapapillomavirus 4</i> <i>Gammapapillomavirus 5</i> <i>Gammapapillomavirus 6</i> <i>Gammapapillomavirus 7</i> <i>Gammapapillomavirus 8</i> <i>Gammapapillomavirus 9</i> <i>Gammapapillomavirus 10</i> <i>Gammapapillomavirus 11</i> <i>Gammapapillomavirus 12</i> <i>Gammapapillomavirus 13</i> <i>Gammapapillomavirus 14</i> <i>Gammapapillomavirus 15</i>	79 tipos

	<i>Gammapapillomavirus 16</i> <i>Gammapapillomavirus 17</i> <i>Gammapapillomavirus 18</i> <i>Gammapapillomavirus 19</i> <i>Gammapapillomavirus 20</i>	
<i>Iotapapillomavirus</i>	<i>Iotapapillomavirus 1</i>	
<i>Kappapapillomavirus</i>	<i>Kappapapillomavirus 1</i> <i>Kappapapillomavirus 2</i>	
<i>Lambdapapillomavirus</i>	<i>Lambdapapillomavirus 1</i> <i>Lambdapapillomavirus 2</i> <i>Lambdapapillomavirus 3</i> <i>Lambdapapillomavirus 4</i> <i>Lambdapapillomavirus 5</i>	
<i>Mupapillomavirus</i>	<i>Mupapillomavirus 1</i> <i>Mupapillomavirus 2</i>	3 tipos
<i>Nupapillomavirus</i>	<i>Nupapillomavirus 1</i>	
<i>Omegapapillomavirus</i>	<i>Omegapapillomavirus 1</i>	
<i>Omikronpapillomavirus</i>	<i>Omikronpapillomavirus 1</i>	
<i>Phipapillomavirus</i>	<i>Phipapillomavirus 1</i>	
<i>Pipapillomavirus</i>	<i>Pipapillomavirus 1</i> <i>Pipapillomavirus 2</i>	
<i>Psipapillomavirus</i>	<i>Psipapillomavirus 1</i>	
<i>Rhopapillomavirus</i>	<i>Rhopapillomavirus 1</i>	
<i>Sigmapapillomavirus</i>	<i>Sigmapapillomavirus 1</i>	
<i>Taupapillomavirus</i>	<i>Taupapillomavirus 1</i> <i>Taupapillomavirus 2</i>	
<i>Thetapapillomavirus</i>	<i>Thetapapillomavirus 1</i>	
<i>Upsilonpapillomavirus</i>	<i>Upsilonpapillomavirus 1</i> <i>Upsilonpapillomavirus 2</i> <i>Upsilonpapillomavirus 3</i>	
<i>Xipapillomavirus</i>	<i>Xipapillomavirus 1</i> <i>Xipapillomavirus 2</i>	
<i>Zetapapillomavirus</i>	<i>Zetapapillomavirus 1</i>	

ANEXO B

Géneros y especies del VPH

Fuente: ICTV.

Tipo	Género	Especie	GenBank ID	Fecha de presentación
HPV32	<i>Alpha</i>	Alpha-1	X74475	1986-04
HPV42		Alpha-1	M73236	21/09/1987
HPV3		Alpha-2	X74462	1984
HPV10		Alpha-2	X74465	1984
HPV28		Alpha-2	U31783	23/04/1986
HPV29		Alpha-2	U31784	1986-04
HPV77		Alpha-2	Y15175	31/07/1995
HPV78		Alpha-2	AB793779	03/01/1995
HPV94		Alpha-2	AJ620211	23/10/2002
HPV117		Alpha-2	GQ246950	02/07/2009
HPV125		Alpha-2	FN547152	08/09/2009
HPV160		Alpha-2	AB745694	06/09/2012
HPV61		Alpha-3	U31793	01/03/1989
HPV62		Alpha-3	AY395706	01/03/1998
HPV72		Alpha-3	X94164	11/10/1993
HPV81		Alpha-3	AJ620209	06/08/1996
HPV83		Alpha-3	AF151983	12/06/1998
HPV84		Alpha-3	AF293960	05/04/2000
HPV86		Alpha-3	AF349909	01/09/2000
HPV87		Alpha-3	AJ400628	31/08/2000
HPV89		Alpha-3	AF436128	27/08/2001
HPV102		Alpha-3	DQ080083	15/09/2004
HPV114		Alpha-3	GQ244463	14/11/2008
HPV2		Alpha-4	X55964	1984
HPV27		Alpha-4	X74473	
HPV57		Alpha-4	X55965	26/06/1989

HPV26	Alpha-5	X74472	10/04/1985
HPV51	Alpha-5	M62877	06/01/1987
HPV69	Alpha-5	AB027020	09/09/1991
HPV82	Alpha-5	AB027021	20/01/1997
HPV30	Alpha-6	X74474	1985-04
HPV53	Alpha-6	X74482	17/11/1987
HPV56	Alpha-6	X74483	30/09/1987
HPV66	Alpha-6	U31794	07/08/1981
HPV18	Alpha-7	X05015	1984
HPV39	Alpha-7	M62849	21/09/1987
HPV45	Alpha-7	X74479	28/03/1986
HPV59	Alpha-7	X77858	02/01/1989
HPV68	Alpha-7	X67161	14/03/1981
HPV70	Alpha-7	U21941	19/02/1993
HPV85	Alpha-7	AF131950	02/09/1999
HPV97	Alpha-7	DQ080080	21/07/2004
HPV7	Alpha-8	X74463	1984
HPV40	Alpha-8	X74478	21/09/1987
HPV43	Alpha-8	AJ620205	29/07/1987
HPV91	Alpha-8	AF419318	27/08/2001
HPV16	Alpha-9	K02718	1984
HPV31	Alpha-9	J04353	1985-02
HPV33	Alpha-9	M12732	1985-12-85
HPV35	Alpha-9	X74477	1986-10
HPV52	Alpha-9	X74481	1987-05
HPV58	Alpha-9	D90400	26/06/1988
HPV67	Alpha-9	D21208	30/10/1989
HPV6	Alpha-10	X00203	1984
HPV11	Alpha-10	M14119	1984
HPV13	Alpha-10	X62843	1984
HPV44	Alpha-10	U31788	29/07/1987
HPV74	Alpha-10	AF436130	27/09/1993
HPV34	Alpha-11	X74476	03/12/1985
HPV73	Alpha-11	X94165	11/10/1993
HPV177	Alpha-11		10/07/2013
HPV54	Alpha-13	U37488	10/11/1987

HPV71		Alpha-14	AB040456	09/09/1991
HPV90		Alpha-14	AY057438	27/08/2001
HPV106		Alpha-14	DQ080082	21/07/2004
HPV5	<i>Beta</i>	Beta-1	M17463	1984
HPV8		Beta-1	M12737	1984
HPV12		Beta-1	X74466	1984
HPV14		Beta-1	X74467	22/10/1984
HPV19		Beta-1	X74470	1984-10
HPV20		Beta-1	U31778	18/05/1990
HPV21		Beta-1	U31779	1984-10
HPV24		Beta-1	U31782	1984-10
HPV25		Beta-1	X74471	19/09/1984
HPV36		Beta-1	U31785	1986
HPV47		Beta-1	M32305	27/03/1987
HPV93		Beta-1	AY382778	12/02/2002
HPV98		Beta-1	FM955837	15/07/2004
HPV99		Beta-1	FM955838	15/07/2004
HPV105		Beta-1	FM955841	04/08/2004
HPV118		Beta-1	GQ246951	02/07/2009
HPV124		Beta-1	GQ845446	15/07/2009
HPV143		Beta-1	HM999995	15/02/2010
HPV152		Beta-1	JF304768	14/10/2010
HPV195		Beta-1		22/01/2014
HPV196		Beta-1		22/01/2014
HPV9		Beta-2	X74464	1984
HPV15		Beta-2	X74468	09/10/1984
HPV17		Beta-2	X74469	1984-10
HPV22		Beta-2	U31780	1984
HPV23		Beta-2	U31781	1984-10
HPV37		Beta-2	U31786	1986
HPV38		Beta-2	U31787	1986
HPV80		Beta-2	Y15176	31/07/1995
HPV100		Beta-2	FM955839	26/07/2004
HPV104		Beta-2	FM955840	15/04/2004
HPV107		Beta-2	EF422221	03/11/2006
HPV110		Beta-2	EU410348	28/09/2007

HPV111	Beta-2	EU410349	05/11/2007
HPV113	Beta-2	FM955842	25/03/2008
HPV120	Beta-2	GQ845442	15/07/2009
HPV122	Beta-2	GQ845444	15/07/2009
HPV145	Beta-2	HM999997	15/02/2010
HPV151	Beta-2	FN677756	25/02/2010
HPV159	Beta-2	HE963025	12/07/2012
HPV174	Beta-2	HF930491	06/03/2013
HPV182	Beta-2		21/08/2013
HPV198	Beta-2		25/04/2014
HPV49	Beta-3	X74480	21/04/1987
HPV75	Beta-3	Y15173	05/10/1994
HPV76	Beta-3	Y15174	05/10/1994
HPV115	Beta-3	FJ947080	08/12/2008
HPV92	Beta-4	AF531420	12/10/2001
HPV96	Beta-5	AY382779	04/10/2002
HPV150	Beta-5	FN677755	25/02/2010
HPV185	Beta-5		17/10/2013
HPV4	Gamma-1	X70827	1984
HPV65	Gamma-1	X70829	02/01/1989
HPV95	Gamma-1	AJ620210	05/06/2003
HPV158	Gamma-1		29/05/2012
HPV173	Gamma-1	KF006400	08/12/2012
HPV48	Gamma-2	U31789	17/11/1987
HPV200	Gamma-2	KP692114	04/08/2014
HPV50	Gamma-3	U31790	21/09/1987
HPV188	Gamma-3		17/10/2013
HPV60	Gamma-4	U31792	02/01/1989
HPV88	Gamma-5	EF467176	30/07/2001
HPV101	Gamma-6	DQ080081	21/07/2004
HPV103	Gamma-6	DQ080078	15/09/2004
HPV108	Gamma-6	FM212639	2006-11
HPV109	Gamma-7	EU541441	23/08/2007
HPV123	Gamma-7	GQ845445	15/07/2009
HPV134	Gamma-7	GU117634	02/12/2009
HPV138	Gamma-7	HM999990	07/12/2009

HPV139	Gamma-7	HM999991	07/12/2009
HPV149	Gamma-7	GU117629	02/12/2009
HPV155	Gamma-7	JF906559	16/05/2011
HPV170	Gamma-7	JX413110	07/05/2012
HPV186	Gamma-7		17/10/2013
HPV189	Gamma-7		17/10/2013
HPV193	Gamma-7		22/01/2014
HPV112	Gamma-8	EU541442	21/12/2007
HPV119	Gamma-8	GQ845441	15/07/2009
HPV147	Gamma-8	HM999999	15/02/2010
HPV164	Gamma-8	JX413106	07/05/2012
HPV168	Gamma-8	KC862317	07/05/2012
HPV176	Gamma-8		02/07/2013
HPV116	Gamma-9	FJ804072	13/01/2009
HPV129	Gamma-9	GU233853	02/12/2009
HPV121	Gamma-10	GQ845443	15/07/2009
HPV130	Gamma-10	GU117630	02/12/2009
HPV133	Gamma-10	GU117633	02/12/2009
HPV142	Gamma-10	HM999994	23/12/2009
HPV180	Gamma-10	KC108722	25/07/2013
HPV191	Gamma-10		17/10/2013
HPV126	Gamma-11	AB646346	09/09/2010
HPV136	Gamma-11	HM999988	07/12/2009
HPV140	Gamma-11	HM999992	23/12/2009
HPV141	Gamma-11	HM999993	23/12/2009
HPV154	Gamma-11	NC 021483	31/03/2011
HPV169	Gamma-11	JX413105	07/05/2012
HPV171	Gamma-11	KF006398	08/12/2012
HPV181	Gamma-11		21/08/2013
HPV202	Gamma-11	KP692116	04/08/2014
HPV127	Gamma-12	HM011570	20/11/2009
HPV132	Gamma-12	GU117632	02/12/2009
HPV148	Gamma-12	GU129016	02/12/2009
HPV157	Gamma-12		29/05/2012
HPV165	Gamma-12	JX444072	07/05/2012
HPV199	Gamma-12	KJ913662	19/05/2014

HPV128		Gamma-13	GU225708	02/12/2009
HPV153		Gamma-13	JN171845	24/02/2011
HPV131		Gamma-14	GU117631	02/12/2009
HPV135		Gamma-15	HM999987	07/12/2009
HPV146		Gamma-15	HM999998	15/02/2010
HPV179		Gamma-15	HG421739	19/07/2013
HPV192		Gamma-15		17/10/2013
HPV137		Gamma-16	HM999989	07/12/2009
HPV144		Gamma-17	HM999996	15/02/2010
HPV156		Gamma-18	JX429973	12/04/2011
HPV161		Gamma-19	JX413109	07/05/2012
HPV162		Gamma-19	JX413108	07/05/2012
HPV166		Gamma-19	JX413104	07/05/2012
HPV163		Gamma-20	JX413107	07/05/2012
HPV183		Gamma-20		21/08/2013
HPV194		Gamma-20		22/01/2014
HPV167		Gamma-21	NC_022892	07/05/2012
HPV172		Gamma-22	KF006399	08/12/2012
HPV175		Gamma-23	KC108721	18/06/2013
HPV178		Gamma-24	KJ130020	12/07/2013
HPV190		Gamma-24		17/10/2013
HPV197		Gamma-24	KM085343	14/04/2014
HPV184		Gamma-25	HG530535	15/09/2013
HPV187		Gamma-26		17/10/2013
HPV201		Gamma-27	KP692115	04/08/2014
HPV1	Mu	Mu-1	V01116	1984
HPV63		Mu-2	X70828	11/04/1991
HPV41	Nu	Nu-1	X56147	21/09/1987
"HPV46"			Reclasificado como HPV20 subtipo	
"HPV55"			Reclasificado como HPV44 subtipo	10/11/1987

"HPV64"			Reclasificado como HPV34 subtipo	
"HPV79"			Reemplazado por HPV91	30/12/1996
HPV203	<i>Gamma</i>			13/10/2014
HPV204	<i>Mu</i>			22/10/2014

ANEXO C

Secuenciamiento

El secuenciamiento de ácidos nucleicos permite determinar exactamente el orden de los nucleótidos en una molécula de ADN (108). Hasta mediados de los años 70s no existía un método para secuenciar directamente una molécula de ADN (109). Los primeros métodos para el secuenciamiento del ADN fueron desarrollados en 1977 (108-110). Uno fue el método de escisión química de Maxam-Gilbert y el método más conocido, llamado terminación de la cadena o método de Sanger (109,110). Ambos métodos presenta puntos en comunes como la utilización de enzimas de restricción para escindir el ADN original, la marcación con fluoróforos o radiactiva del ADN y la utilización de electroforesis para distanciar los fragmentos que se generan (111).

Método de Sanger o de terminación de cadena didesoxi

Este método enzimático fue desarrollado por Frederick Sanger y sus colaboradores y, es considerado el estándar de oro para el secuenciamiento de ácidos nucleicos (108,111). Ha sido utilizado como la base para el desarrollo de variantes y de los métodos modernos de secuenciamiento (111). Utiliza síntesis de ADN controlada, generando fragmentos que terminan con nucleótidos específicos del ADN blanco (110,111). El principio de este método está basado en la síntesis de ADN con una ADN polimerasa y en el uso de didesoxirribonucleótidos (ddNTP) «nucleótidos terminadores» (111). El método utiliza cebadores que se hibridan a la cadena de ADN blanco y una mezcla entre desoxirribonucleótidos (dNTP) y ddNTP (111). Los nucleótidos normales o dNTP permiten elongar la cadena de ADN, mientras que los ddNTP al faltarle un grupo OH en el carbono 3' no pueden (111). De esta manera a medida que se sintetizan las cadenas de ADN, se forman fragmentos de distintos tamaños y con un ddNTP específico en su extremo 3' (111). Estos fragmentos son migrados en un gel de electroforesis y revelados para el análisis de la secuencia de ADN (111).

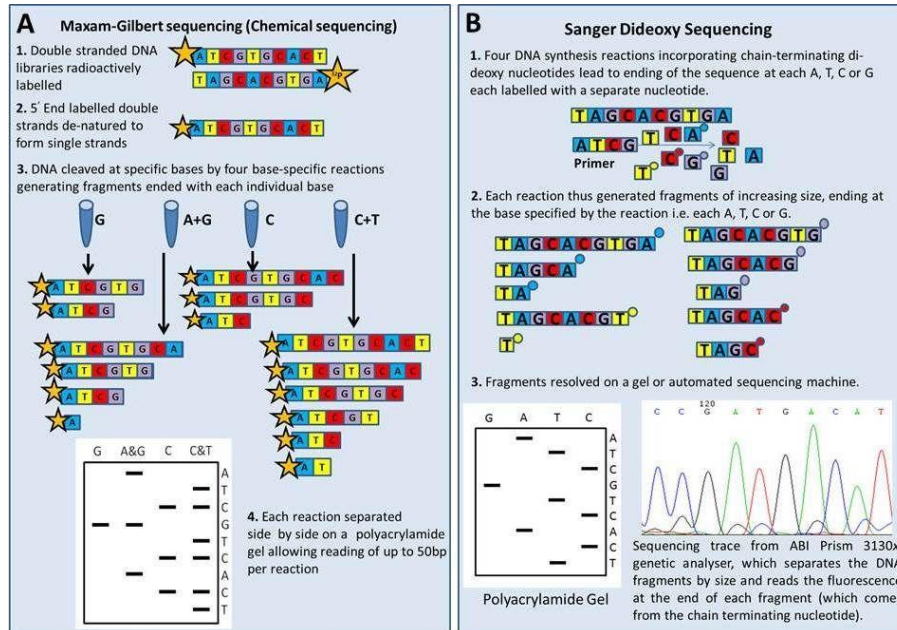


Figura 5.1 Métodos de secuenciación de Maxam-Gilbert (A) y de Sanger (B).
Fuente: Oxbridge Biotech Roundtable (112)

La automatización de este método se llevó a cabo mediante el uso de fluoróforos distintos para cada tipo de ddNTP, y así poder detectarlos simultáneamente en una reacción (111).

ABI PRISM™ 3730xl DNA Analyzer

Es un instrumento de electroforesis capilar con 96 capilares, basado en la química de ddNTP con colorantes específicos para cada uno. Puede cargar entre 8 a 96 muestras por corrida (113). Utiliza la química del BigDye Terminator, siendo éste uno de los más estables. Las químicas que puede utilizar son: BigDye® Terminator v 1.1 y BigDye® Terminator v 3.1 dando lecturas más largas y con gran éxito (114).

Las químicas v 1.1 y 3.1 son reformulaciones de la química original v 1.0 y v 3.0.

Presenta los polímeros POP-7™, POP-4™ y POP-6™ (113).

Aplicaciones	V 3.1	V 1.1
de <i>novο</i> secuenciamiento	†	‡
Resecuenciamiento	†	‡
Secuenciamiento de muestras difíciles	†	†
Secuenciamientos de lecturas largas	†	‡
Secuenciamiento (plásmidos, BAC y fosmidos)	†	‡
Detección de bases mezcladas	†*	‡*
Secuenciamiento de productos de PCR cortos usando los módulos de corrida de electroforesis rápida	‡	†

Tabla XII. Aplicaciones para cada química. (†) Recomendada; (‡) satisfactoria; (*) Ambas químicas sirven para la aplicación.

Fuente: Applied Biosystems (113).

Flujo de trabajo de la secuenciación de ADN automatizada

El flujo de trabajo se resume a cinco pasos esenciales que son:

- 1. Preparación de la muestra de ADN:** En este paso se determina el origen de la muestra, los cebadores utilizados, la calidad y cantidad del ADN.
- 2. Ciclo de secuenciación:** Se selecciona la química a utilizar de secuenciación, se prepara los ciclos para la reacción de secuenciación y se corre la reacción de secuenciación.
- 3. Purificación del producto de extensión:** Se realiza la purificación de los productos de Dye Terminator o productos purificados de cebadores colorantes.
- 4. Electroforesis capilar:** Primero se configura el registro de placa, se carga la muestra y se realiza la corrida. Resultados mostrados en formato *.ab1
- 5. Análisis de los datos:** Se aplica los protocolos de análisis, se corre el análisis y se revisan los datos (113).

Pirosecuenciación

El pirosecuenciación es un método de secuenciación en tiempo real y puede utilizar como material de partida, tanto ADN como ARN (7)(2). Presenta ventajas sobre el método de Sanger en cuanto a la sencillez, velocidad y menos costoso

para su uso en secuencias cortas y medianas (7). La incorporación de un nucleótido conduce a la liberación de un pirofosfato (115). La enzima ATP sulforilasa utiliza el pirofosfato para producir ATP, y éste es luego utilizado por la enzima luciferasa para la formación de luz visible (115). La luz es percibida por un sensor y analizada por el instrumento de secuenciamiento. Mientras que el método de Sanger permite secuenciar un genotipo que se encuentre en altas concentraciones, el pirosecuenciamiento puede detectar los que se encuentren en baja presencia (116).

ANEXO D

Cebadores utilizados en la tesis

Cebador	Secuencia (5'-3')	Longitud (nt)	Tipo	Blanco	Amplicón (pb)
MY11	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG	20	Forward	VPH	450
MY09	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC	20	Reverse	VPH	
PC03	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	20	Forward	β -Globina	110
PC04	CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC	20	Reverse	β -Globina	
T7	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	20	Forward	Promotor T7	Depende del inserto
SP6	GAT TTA GGT GAC ACT ATA G	19	Reverse	Promotor SP6	

ANEXO E

Aprobación del Comité de Ética



MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA
DIRECCIÓN PROVINCIAL DE SALUD DEL GUAYAS

Guayaquil, 12 de abril de 2013

Señor Doctor
CÉSAR BEDOYA
Investigador Principal
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD PÚBLICA "INSPI"
Presente

De nuestra consideración:

El Comité de Bioética institucional del Hospital del Niño "Dr. Francisco de Ycaza Bustamante", en la sesión del 11 de marzo de 2013, luego del análisis pormenorizado del Proyecto de Investigación "Epidemiología Molecular del Virus de Papiloma Humano para la prevención del Cáncer de Cérvico-Uterino en mujeres de la Región Litoral del Ecuador" SENESCYT PIC-12-HN-001, resolvió aprobarlo.

El Comité solicita a los responsables de la ejecución del Proyecto que presenten los informes del avance del mismo, efectos adversos y demás pormenores que se adviertan en su desarrollo. Un delegado de este organismo supervisará el trabajo.

Hacemos propicia la oportunidad para expresarle nuestros sentimientos de consideración y alta estima.

Atentamente,


Dr. Antonio Aguilar Guzmán
PRESIDENTE


Dr. Francisco Pareja Morante
SECRETARIO

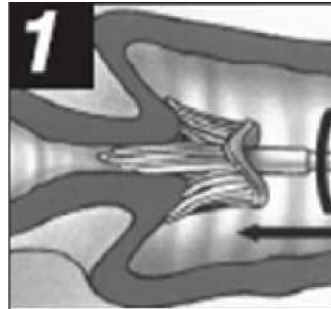
c.c.: Comité de Bioética

ANEXO F

Breve guía para la recogida de muestras cervicales usando el cepillo Rovers Cervex® y el cobas® PCR *Cell Collection Media*

1. RECOGER:

- Usar guantes.
- Para recolectar, colocar las cerdas centrales del cepillo en el canal endocervical.
- Inserte el cepillo lo suficientemente profundo para permitir que las cerdas más cortas estén completamente en contacto con el ectocérvix.
- Empuje suavemente y gire en sentido horario la escoba cinco veces.



2. ENJUAGUAR:

- Enjuague el cepillo en el cobas® PCR *Cell Collection Media* empujando la escoba en la parte inferior de la cubeta diez veces, obligando a las cerdas separarse.

- Remoline la escoba vigorosamente para liberar aún más el material.
- Deseche el dispositivo de recolección.
- No deje la cabeza de escoba en el frasco.



3. CERRAR:

- Apriete la tapa para que la línea de esfuerzo de torsión de la tapa pase la línea de esfuerzo de torsión en el vial.
- La muestra está ahora lista para el transporte.



ANEXO G

Controles positivos

Los controles positivos fueron realizados mediante la amplificación y subsecuente clonación de amplicones generados por los sets de cebadores MY para VPH y para β -globina (PC03-PC04) (ver ANEXO D), a partir del ADN de células SiHa (ATCC® HTB-35™). Esta línea celular humana proviene de carcinoma cervical y está infectada con una a dos copias del VPH 16 (117). La extracción de ADN de SiHa se realizó con *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen), siguiendo el protocolo (ver ANEXO H) recomendado por el fabricante. La amplificación se llevó a cabo mediante el uso de la enzima *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen™), bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (ver ANEXO I). Los productos de PCR fueron revelados en gel de agarosa al 2% y purificado con *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche Applied Science) con el protocolo disponible en internet. Se realizó la clonación de los productos purificados y el aislamiento de los plásmidos como se detalla a continuación.

Ligación

Mediante el uso de la técnica de clonación T/A, el producto purificado fue ligado con la ayuda de la enzima T4 DNA ligase, siguiendo el protocolo detallado del kit pGEM®-T Easy Vector System (Promega), con un tiempo de incubación de una hora a temperatura ambiente.

Componente	1 rxn (uL)
2x rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase	5
pGEM-T or pGEM-T Easy Vector (50ng)	1
Producto purificado	3
T4 DNA Ligase	1
TOTAL	10

Componentes para la ligación de los productos de PCR

Transformación

A partir del producto ligado se realizó la transformación en células DH5 α TM (InvitrogenTM), siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante.

TRANSFORMACIÓN (SUBCLONING EFFICIENCYTM DH5ATM COMPETENT CELLS)

1. Descongelar en hielo un tubo de células DH5a TM. Coloque tubos blancos de 15 ml en hielo húmedo. Colocar las puntas a utilizar a 4 °C.
2. Mezclar suavemente las células con la punta de pipeta y alícuotar de 50 μ l de células para cada transformación en un tubo blanco de 15 ml.

3. Volver a congelar las células no utilizados en el baño de hielo seco / etanol durante 5 minutos antes de volver al -80 °C congelador. No utilice nitrógeno líquido.
4. Añadir 1 a 5 µl (1-10 ng) de ADN a las células y mezclar suavemente. No mezcle con la pipeta hacia arriba y abajo. Para el control pUC19, añadir 2,5 µl (250 pg) de ADN a las células y mezclar suavemente.
5. Incubar los tubos en hielo durante 30 minutos.
6. Choque térmico de células durante 20 segundos en un 42 °C baño de agua sin agitación.
7. Colocar los tubos en hielo durante 2 minutos.
8. Añadir 950 µl de medio LB broth (sin ampicilina) a cada tubo (para que se recuperen las bacterias).
9. Incubar los tubos a 37 °C durante 1 hora a 225 rpm.
 - 9.1 Colocar 100 uL de IPTG y 20 uL de X-gal y plaquear. Dejar a 37 °C en la incubadora por media hora.
10. Transferir el contenido de cada tubo a un tubo de 1.5 ml y centrifugar a 6000g por 3min (menos el de pUC19). Eliminar el sobrenadante y dejar 100 uL para la siembra.

11. Plaquear 100 uL de cada tubo.

12. Incubar las placas durante toda la noche a 37 °C.

Comprobación de inserto

Esto se lo realizó mediante una PCR, picando media colonia blanca y utilizando los cebadores SP6 y T7 que se hibridan en los promotores con el mismo nombre presentes en el vector y siguiendo el protocolo de PCR (ver ANEXO I).

Cultivo

Una vez comprobado el inserto, las colonias fueron cultivadas en 3 mL de medio LB Broth con ampicilina a 37°C toda la noche.

Aislamiento de plásmidos

Para el aislamiento de plásmido se utilizó el kit comercial High Pure Plasmid Isolation (Roche Molecular Systems) bajo el protocolo proporcionado por el fabricante y disponible en internet; se cuantificó y evaluó la calidad del ADN con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific™) del Laboratorio de Biomedicina de ESPOL. Se comprobó por medio de secuenciamiento (Genewiz, Inc.) con cebadores T7 y SP6 la presencia del inserto con el genotipo esperado.

ANEXO H

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN PARA MUESTRA DE CEPILLADO

- Programar el termoblock a 56°C. antes de empezar la extracción.
 - Verificar AW1 y AW2 que estén preparados según indicaciones del fabricante y que Buffer AL no esté precipitado.
1. Se toma 1ml de la(s) muestra(s) y se centrifuga a 8000rpm o 6000 g durante 5 min. Este paso se repite hasta que la concentración de Pellet sea adecuada para la extracción (5ml aproximadamente).
 2. Decantar hasta sólo dejar el Pellet.
 3. Se coloca 20µl de proteinasa K en la muestra y 200µl de PBS.
 4. Colocar 4µl de RNasa A (100mg/ml) y mezclar e incubar por 15 min a 37°C.
 5. Colocar 200µL Buffer AL. Se realiza vortex para homogeneizar.

Nota 1: No colocar la proteinasa K y el Buffer AL al mismo tiempo

Nota 2: Si el pellet de células es muy abundante, la colocación de la proteinasa K, el PBS y el Buffer AL deberán ser aumentados de manera proporcional ejemplo: 30ul, 300ul y 300ul respectivamente.

6. Se incuba en el termoblock con una ligera agitación a 56 °C, por un tiempo mínimo de 10 minutos.
7. Centrifugar brevemente para remover las gotas de la tapa.

8. Adicionar 400 μ l de etanol al 100% a la muestra y mezclar por 15 segundos en el vortex. Brevemente centrifugar para remover las gotas de la tapa.
9. Cuidadosamente colocar 700 μ l de la mezcla en la columna cuidando de no topar los bordes del tubo. Tapar la columna colocarla dentro del tubo de 2ml y centrifugar a 8.000 rpm o 6.000g por 1 min.
10. Colocar la columna en un tubo limpio y descartar el filtrado.
11. Cuidadosamente abrir la columna y adicionar 500 μ l de Buffer AW1 sin topar los bordes del tubo, tapar la columna.
12. Centrifugar a 8.000 rpm por 1 min.
13. Colocar la columna en un tubo limpio y descartar el filtrado.
14. Cuidadosamente abrir la columna y adicionar 500 μ l de Buffer AW2 sin topar los bordes del tubo. Tapar la columna.
15. Centrifugar a 14.000 rpm por 3min.
16. Colocar la columna en un tubo limpio de 2ml y descartar el filtrado.
17. Centrifugar a 14.000 rpm por 1 min y descartar el filtrado.
18. Colocar la columna en un tubo limpio eppendorf de 1.5 ml.
19. Adicionar 50 a 100 μ l de Buffer AE e incubar a temperatura ambiente por 1 min y luego centrifugar a 8.000 rpm por 1min.
20. Colocar el ADN extraído para la conservación a -80 °C.

ANEXO I

Componentes de la PCR para la amplificación del VPH

Componente	Volumen (1 rxn)	Concentración Final
10X PCR Buffer - Mg	2.5 µL	1X
10 mM dNTP mix	0.5 µL	0.2 mM cada uno
50 mM MgCl₂	0.75 µL	1.5 mM
Primer mix (10 µM cada uno)	0.5 µL	0.2 µM
Platinum® Taq DNA Polymerase	0.1 µL	1 unidad
Agua ultra pura	a 25 µL	-
Muestra	~	-
TOTAL	25 µL	

Con el programa de termociclado siguiente:

Paso		Temperatura	Duración
Desnaturalización inicial		94 °C	2 min
45 ciclos	Desnaturalización	94 °C	30 seg
	Hibridación	55 °C	30 seg
	Elongación	72 °C	1 min
Elongación final		72 °C	8 min
Mantenimiento		15 °C	~

BIBLIOGRAFÍA

1. Sánchez M. Distribución de genotipos en mujeres conizadas por lesión escamosa intraepitelial de alto grado (CIN 2-3) y análisis de los cofactores de cáncer de cérvix en Málaga. Universidad de Málaga; 2012.
2. Zheng BY, Gharizadeh B, Wallin KL. Human Papillomaviruses Genotyping by Pyrosequencing Method. *Appl Microbiol*. 2007;001(650):547–56.
3. Seaman WT, Andrews E, Couch M, Kojic EM, Cu-Uvin S, Palefsky J, et al. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. *Viol J [Internet]*. enero de 2010;7:194. Recuperado a partir de:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2933591&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Kroupis C, Vourlidis N. Human papilloma virus (HPV) molecular diagnostics. *Clin Chem Lab Med*. 2011;49(11):1783–99.
5. Bertaut A, Chavanet P, Aho S, Astruc K, Douvier S, Fournel I. HPV vaccination coverage in French girls attending middle and high schools: a declarative cross sectional study in the department of Côte d'Or. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol [Internet]*. octubre de 2013 [citado 2 de diciembre de 2014];170(2):526–32. Recuperado a partir de:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23953913>
6. Vera-Uehara C, Sánchez-Alemán MA, Uribe-Salas FJ, Ramos-Castañeda J, Olamendi-Portugal ML, Conde-Glez CJ. HPV infection, risk factors and viral load among Mexican male college students. *Braz J Infect Dis [Internet]*. 2013 [citado 2 de diciembre de 2014];18(1):71–6. Recuperado a partir de:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24055311>
7. Abreu ALP, Souza RP, Gimenes F, Consolaro MEL. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Viol J [Internet]*. 2012;9:262. Recuperado a partir de:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3507852&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

8. STD Facts - Human papillomavirus (HPV) [Internet]. Recuperado a partir de: <http://www.cdc.gov/std/HPV/STDFact-HPV.htm>
9. Guo M, Sneige N, Silva EG, Jan YJ, Cogdell DE, Lin E, et al. Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Mod Pathol* [Internet]. febrero de 2007 [citado 11 de enero de 2015];20(2):256–66. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17192787>
10. Cirigliano V, Darwich L, Sirera G, Coll J, Clotet B, Videla S. Comparison of the f-HPV typing™ and Hybrid Capture II® assays for detection of high-risk HPV genotypes in cervical samples. *J Virol Methods*. 2012;183:14–8.
11. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* [Internet]. mayo de 2006 [citado 17 de septiembre de 2014];110(5):525–41. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16597322>
12. Coronel VP. Prevalencia de infección por virus de papiloma humano de alto riesgo y factores asociados en mujeres que acudieron al centro de atención ambulatoria 302 del IESS en el año 2013. Cuenca. 2013. Universidad de Cuenca; 2014.
13. Carvajal-Rodríguez a. Detecting recombination and diversifying selection in human alpha-papillomavirus. *Infect Genet Evol*. 2008;8(5):689–92.
14. IARC. International Agency for Research on Cancer: A Review of Human Carcinogens: Biological Agents. IARC Monogr Eval Carcinog Risks to Humans [Internet]. 2012;100:255–96. Recuperado a partir de: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100B/index.php>
15. Biassoni R, Raso A. Quantitative Real-Time PCR. Genova , Italy: Humana Press; 2014. 1-223 p.
16. Rosenblatt A, de Campos H. Human Papillomavirus a Practical Guide for Urologists. 2009.
17. Chen Z, Schiffman M, Herrero R, DeSalle R, Anastos K, Segondy M, et al. Evolution and taxonomic classification of human papillomavirus 16 (HPV16)-

related variant genomes: HPV31, HPV33, HPV35, HPV52, HPV58 and HPV67. *PLoS One*. 2011;6(5).

18. Tornesello ML, Buonaguro L, Izzo S, Lopez G, Vega X, Reyes CFM, et al. A pilot study on the distribution of human papillomavirus genotypes and HPV-16 variants in cervical neoplastic lesions from ecuadorian women. *J Med Virol*. 2008;80(11):1959–65.
19. De Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* [Internet]. 20 de junio de 2004 [citado 11 de julio de 2014];324(1):17–27. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049>
20. Castañeda Iñiguez MS. El cáncer cervical como problema de salud pública en mujeres mexicanas y su relación con el virus de papiloma humano. [Internet]. Universidad Autónoma de Barcelona; 2005. Recuperado a partir de: <http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/4610/msci1de1.pdf;jsessionid=04199CF8B688E6B39FD47472F0236455.tdx2?sequence=1>
21. Cruz JF, Márquez L, Quintero M, Bastidas M, Puig J. Estudio de variantes intra-tipo del virus del papiloma humano tipo16 , por análisis nucleotídico de la región MY09-MY11. *Obs Ginecol*. 2013;73(3):187–94.
22. Calleja-macias IE, Villa LL, Prado JC, Allan B, Williamson A, Collins RJ, et al. Worldwide Genomic Diversity of the High-Risk Human Papillomavirus Types 31 , Human Papillomavirus Type 16 Worldwide Genomic Diversity of the High-Risk Human Papillomavirus Types 31 , 35 , 52 , and 58 , Four Close Relatives of Human Papillomavirus Type 16. 2005;79(21):13630–40.
23. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology* [Internet]. Elsevier; 2015;476:341–4. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682214005777>
24. Dickson EL, Vogel RI, Geller M a, Downs LS. Cervical cytology and multiple type HPV infection: a study of 8182 women ages 31-65. *Gynecol Oncol* [Internet]. Elsevier Inc.; junio de 2014 [citado 26 de noviembre de 2014];133(3):405–8. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24657488>

25. Kaslow R, Stanberry L, Le Duc J, editores. *Viral infections of Humans*. Fifth edit. Springer; 2014. 1207 p.
26. Reference clones at International HPV Reference Center [Internet]. [citado 25 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: [http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html?%3C?php echo time\(\); ?%3E](http://www.hpvcenter.se/html/refclones.html?%3C?php echo time(); ?%3E)
27. ICTV Virus Taxonomy 2014 [Internet]. [citado 25 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>
28. WHO | Human papillomavirus (HPV) and cervical cancer. World Health Organization; [citado 27 de enero de 2015]; Recuperado a partir de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs380/en/#>
29. Aboul-Fotouh ME-M, Hana IT. Clinical validation of high risk HPV DNA testing versus ThinPrep cytology for primary cervical cancer screening. *Middle East Fertil Soc J* [Internet]. Middle East Fertility Society; junio de 2013 [citado 27 de noviembre de 2014];18(2):102–9. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1110569012001227>
30. Aksoy P, Abban CY, Kiyashka E, Qiang W, Meneses PI. HPV16 infection of HaCaTs is dependent on β 4 integrin, and α 6 integrin processing. *Virology* [Internet]. 20 de enero de 2014 [citado 2 de diciembre de 2014];449:45–52. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24418536>
31. Yu D, Chen Y, Wu S, Wang B, Tang Y, Li L. Simultaneous Detection and Differentiation of Human Papillomavirus Genotypes 6, 11, 16 and 18 by AllGlo Quadruplex Quantitative PCR. 2012;7(11).
32. Garcea RL, DiMaio D, Papillomaviruses T. *The Papillomaviruses* [Internet]. First edit. New York: Springer; 2007. 419 p. Recuperado a partir de: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-0-387-36523-7>
33. Stanley M a. Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clin Microbiol Rev* [Internet]. abril de 2012 [citado 2 de diciembre de 2014];25(2):215–22. Recuperado a partir de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3346303&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

34. Kajitani N, Satsuka A, Kawate A, Sakai H. Productive lifecycle of human papillomaviruses that depends upon squamous epithelial differentiation. *Front Microbiol.* 2012;3(APR):1–12.
35. PaVE: Papilloma virus genome database [Internet]. [citado 25 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: http://pave.niaid.nih.gov/#explore/review_chapters
36. Lazarczyk M, Cassonnet P, Pons C, Jacob Y, Favre M. The EVER proteins as a natural barrier against papillomaviruses: a new insight into the pathogenesis of human papillomavirus infections. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. junio de 2009 [citado 7 de febrero de 2015];73(2):348–70. Recuperado a partir de: <http://mmbbr.asm.org/content/73/2/348/F2.expansion.html>
37. Chung B. *Transmission and transformation: Reviewing HPV 's lifecycle.* New Jersey; 2014.
38. Howie HL, Katzenellenbogen R a., Galloway D a. Papillomavirus E6 proteins. *Virology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009;384(2):324–34. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.017>
39. IARC. *Human Papillomaviruses* [Internet]. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2007. Recuperado a partir de: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol90/mono90-6.pdf>
40. Hildesheim A. Human papillomavirus variants: implications for natural history studies and vaccine development efforts. *J Natl Cancer Inst.* 1997;89(11):752–3.
41. Akagi K, Li J, Broutian TR, Padilla-Nash H, Xiao W, Jiang B, et al. Genome-wide analysis of HPV integration in human cancers reveals recurrent, focal genomic instability. *Genome Res.* 2014;24:185–99.
42. Agnihotram Ramanakumar, Otelinda Goncalves, Harriet Richardson, Pierre Tellier, Alex Ferenczy, François Coutlée EF. Human papillomavirus (HPV) types 16, 18, 31, 45 DNA loads and HPV-16 integration in persistent and transient infections in young women. *BMC Infect Dis.* 2010;10:326.

43. Sarduy M. Neoplasia Intraepitelial Cervical. Preámbulo del cáncer cérvicouterino. 2008;1(Centro de Investigaciones Médico-Quirúrgicas. (CIMEQ). La Habana, Cuba.):1–13.
44. Human papillomavirus (HPV) and Oropharyngeal Cancer | Sexually Transmitted Diseases | CDC. [citado 4 de marzo de 2015]; Recuperado a partir de: <http://www.cdc.gov/std/hpv/stdfact-hpvandoralcancer.htm>
45. Stockman J a. Prevalence of Oral HPV Infection in the United States, 2009-2010. *Yearb Pediatr.* 2013;2013(7):10–2.
46. Fakhry C, D'Souza G. Discussing the diagnosis of HPV-OSCC: common questions and answers. *Oral Oncol* [Internet]. Elsevier Ltd; septiembre de 2013 [citado 11 de noviembre de 2014];49(9):863–71. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23876627>
47. Touyz LZG. Kissing: hullo HPV. *Curr Oncol.* 2011;18:167–8.
48. Touyz LZG. Kissing and HPV: honest popular visions, the human papilloma virus, and cancers. *Curr Oncol.* 2014;21:515–7.
49. Kreimer AR. Oral sexual behaviors and the prevalence of oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009;199:1253–4.
50. 2012 STD Surveillance Other STDs | CDC [Internet]. Recuperado a partir de: <http://www.cdc.gov/std/stats12/other.htm#hpv>
51. Brown CR, Leon ML, Muñoz K, Fagioni a., Amador LG, Frain B, et al. Human papillomavirus infection and its association with cervical dysplasia in Ecuadorian women attending a private cancer screening clinic. *Brazilian J Med Biol Res.* 2009;42:629–36.
52. Marengo C, Rivadeneira N, Ruiz JC. Tipificación de HPV en cáncer de cérvix en inclusión de parafina. *Oncol.* 2010;20(3):93–8.
53. Blakely T, Kvizhinadze G, Karvonen T, Pearson AL, Smith M, Wilson N. Cost-effectiveness and equity impacts of three HPV vaccination programmes for school-aged girls in New Zealand. *Vaccine* [Internet]. Elsevier Ltd; 7 de mayo de 2014 [citado 30 de noviembre de

- 2014];32(22):2645–56. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662710>
54. HPV Vaccine, Quadrivalent [Internet]. [citado 10 de diciembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/othercarcinogens/infectiousagents/hpv/hpv-vaccine-quadrivalent>
 55. HPV Vaccine, Bivalent [Internet]. [citado 10 de diciembre de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/othercarcinogens/infectiousagents/hpv/hpv-vaccine-bivalent>
 56. Mammas IN, Spandidos D a., Sourvinos G. Genomic diversity of human papillomaviruses (HPV) and clinical implications: An overview in adulthood and childhood. *Infect Genet Evol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;21:220–6. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.11.002>
 57. Gardasil. GARDASIL® 9 (Human Papillomavirus 9-valent Vaccine, Recombinant) [Internet]. Whitehouse Station; 2014. Report No.: NJ 08889. Recuperado a partir de: www.merck.com/product/patent/home.html The
 58. GlaxoSmithKline. CERVARIX [Human Papillomavirus Bivalent (Types 16 and 18) Vaccine, Recombinant]. Rixensart, Belgium; 2009.
 59. Gardasil. Gardasil [Human Papillomavirus Quadrivalent (Types 6, 11, 16, and 16) Vaccine, Recombinant] [Internet]. Whitehouse Station; 2014. Report No.: NJ 08889. Recuperado a partir de: http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/g/gardasil/gardasil_pi.pdf
 60. Allison M a, Dunne EF, Markowitz LE, O’Leary ST, Crane L a, Hurley LP, et al. HPV vaccination of boys in primary care practices. *Acad Pediatr* [Internet]. Elsevier Ltd; 2013 [citado 2 de diciembre de 2014];13(5):466–74. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24011749>
 61. Ferrera A, Bakkers JMJE, Massuger LFAG, Melchers WJG. High HPV 16 Viral Load is Associated with Increased Cervical Dysplasia in Honduran Women. 2008;78(5):843–6.

62. Ursu RG, Onofriescu M, Nemescu R. Detection of hpv 16 and hpv 18 viral loads by real time pcr in women with cervical dysplasia. 2011;25–9.
63. Molijn A, Kleter B, Quint W, van Doorn L-J. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. 2005;32 Suppl 1:1–24.
64. Qu W, Jiang G, Cruz Y, Chang CJEN, Ho GYF, Klein RS, et al. PCR Detection of Human Papillomavirus : Comparison between MY09 / MY11 and GP5 2 / GP6 2 Primer Systems. *Clin Microbiol*. 1997;35(6):1304–10.
65. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim a., et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*. 2000;38(1):357–61.
66. Speich N, Schmitt C, Bollmann R, Bollmann M. Human papillomavirus (HPV) study of 2916 cytological samples by PCR and DNA sequencing: Genotype spectrum of patients from the west German area. *J Med Microbiol*. 2004;53(2):125–8.
67. Venturoli S, Leo E, Nocera M, Barbieri D, Cricca M, Costa S, et al. Comparison of Abbott RealTime High Risk HPV and Hybrid Capture 2 for the detection of high-risk HPV DNA in a referral population setting. *J Clin Virol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;53(2):121–4. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2011.10.016>
68. Chung H, Hahm C, Lee M. Comparison of the clinical performances of the AdvanSure HPV Screening Real-Time PCR, the Abbott Real-Time High-Risk HPV Test, and the Hybrid Capture High-Risk HPV DNA Test for Cervical Cancer Screening. *J Virol Methods* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;205:57–60. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.04.021>
69. Rao A, Sandri MT, Sideri M, Young S, Sharma A, Behrens C. Comparison of hybrid capture 2 High-Risk HPV results in the low positive range with cobas® HPV Test results from the ATHENA study. *J Clin Virol* [Internet]. Elsevier B.V.; septiembre de 2013 [citado 2 de diciembre de 2014];58(1):161–7. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23895930>

70. Abramowitz L, Jacquard A-C, Jaroud F, Haesebaert J, Siproudhis L, Pradat P, et al. Human papillomavirus genotype distribution in anal cancer in France: the EDiTH V study. *Int J Cancer* [Internet]. 15 de julio de 2011 [citado 2 de diciembre de 2014];129(2):433–9. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20839262>
71. Else EA, Swoyer R, Zhang Y, Taddeo FJ, Lawson J, Hyfte I Van, et al. Comparison of Real-Time Multiplex Human Papillomavirus (HPV) PCR Assays with INNO-LiPA HPV Genotyping Extra Assay □. 2011;49(5):1907–12.
72. INNO-LiPA® HPV Genotyping Extra - Identification of 28 genotypes [Internet]. [citado 31 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.fujirebio-europe.com/products-services/product-browser/inno-lipa-hpv-genotyping-extra-2>
73. Bernal S, Palomares JC, Artura A, Parra M, Cabezas JL, Robles A, et al. Comparison of urine and cervical samples for detecting human papillomavirus (HPV) with the Cobas 4800 HPV test. *J Clin Virol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014;61(4):548–52. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.10.001>
74. Takara. PCR Human Papillomavirus Typing Set [Internet]. 1996. Recuperado a partir de: <http://www.takara-bio.com>
75. IntelliPlex™ HPV Genotyping Kit - PlexBio Co., Ltd. [Internet]. [citado 31 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.plexbio.com/en/1_multiplex/p_hpv_kit.html
76. Qiagen. Detection Kit Handbook Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies. 2010.
77. Geraets DT, Lenselink CH, Bekkers RLM, van Doorn LJ, Quint WG V, Melchers WJG. Universal human papillomavirus genotyping by the digene HPV Genotyping RH and LQ Tests. *J Clin Virol* [Internet]. Elsevier B.V.; 2011;50(4):276–80. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2010.12.011>
78. Halfon P, Sandri MT, Raimondo A, Ravet S, Khiri H, Sideri M, et al. Comparison of the performance of carcinogenic HPV typing of the Roche

- Linear Array and Qiagen LiquiChip® HPV assays. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2013;13:499. Recuperado a partir de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4015444&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
79. Panagene. PANArray™ HPV Genotyping Chip [Internet]. PHP-1001. USA; Recuperado a partir de: http://www.panagene.com/hp_yeh/eng/product/product_hpv.php
 80. Sehnaal B, Dusek L, Cibula D, Zima T, Halaska M, Driak D, et al. The relationship between the cervical and anal HPV infection in women with cervical intraepithelial neoplasia. *J Clin Virol* [Internet]. Elsevier B.V.; enero de 2014 [citado 2 de diciembre de 2014];59(1):18–23. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24315797>
 81. Chun JY, Kim KJ, Hwang IT, Kim YJ, Lee DH, Lee IK, et al. Dual priming oligonucleotide system for the multiplex detection of respiratory viruses and SNP genotyping of CYP2C19 gene. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(6):6–11.
 82. Hwang IT, Kim YJ, Kim SH, Kwak C II, Gu YY, Chun JY. Annealing control primer system for improving specificity of PCR amplification. *Biotechniques*. 2003;35(6):1180–4.
 83. Dolinger DL. TOCE™ - Chemistry for a new generation of molecular diagnostics. *Transl Med*. 2013;3(2):4172.
 84. Ratnam S, Coutlee F, Fontaine D, Bentley J, Escott N, Ghatage P, et al. Clinical performance of the PreTect HPV-proofer E6/E7 mRNA assay in comparison with that of the hybrid capture 2 test for identification of women at risk of cervical cancer. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2010;48(8):2779–85. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2916571/>
 85. Molden T, Kraus I, Skomedal H, Nordstrøm T, Karlsen F. PreTect HPV-Proofer: real-time detection and typing of E6/E7 mRNA from carcinogenic human papillomaviruses. *J Virol Methods* [Internet]. junio de 2007 [citado 1 de abril de 2015];142(1-2):204–12. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379322>
 86. Export FUS, Information G, Use I. APTIMA® HPV Assay. *Proteins*. :1–54.

87. NucliSENS EasyQ® HPV - Prueba de última generación para el diagnóstico del cáncer cervical - bioMérieux Argentina s.a [Internet]. [citado 1 de abril de 2015]. Recuperado a partir de: http://www.biomerieux.com.ar/servlet/srt/bio/argentina/dynPage?doc=ARG_CLN_PRD_G_PRD_CLN_11
88. Jeantet D, Schwarzmans F, Tromp J, Melchers WJG, van der Wurff AAM, Oosterlaken T, et al. NucliSENS EasyQ HPV v1 test - Testing for oncogenic activity of human papillomaviruses. *J Clin Virol* [Internet]. julio de 2009 [citado 1 de abril de 2015];45 Suppl 1:S29–37. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19651366>
89. Brief T. Health Policy Advisory Committee on Technology Technology Brief. 2013;(August).
90. Eriksson A, Herron JR, Yamada T, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol*. 1999;80(3):595–600.
91. Pavla A, Diniz A, Chagas BS, Medeiros C, Conceição K, Nascimento G, et al. Prevalence of Human Papillomavirus Variants and Genetic Diversity in the L1 Gene and Long Control Region of HPV16 , HPV31 , and HPV58 Found in North-East Brazil. *BioMed* [Internet]. 2015;2015:1–12. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/130828>
92. Arroyo SL, Basaras M, Arrese E, Hernáez S, Andía D, Esteban V, et al. Human papillomavirus (HPV) genotype 18 variants in patients with clinical manifestations of HPV related infections in Bilbao, Spain. *Virol J* [Internet]. 2012;9:258. Recuperado a partir de: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3495774&tool=p_mcentrez&rendertype=abstract
93. Bae JH, Cheung JLK, Lee SJ, Luk ACS, Tong SY, Chan PKS, et al. Distribution of human papillomavirus type 58 variants in progression of cervical dysplasia in Korean women. *J Microbiol Biotechnol*. 2009;19(9):1051–4.
94. Bobek V, Kolostova K, Pinterova D, Kacprzak G, Adamiak J, Kolodziej J, et al. A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanoma. *Anticancer Res*. 2010;30(12):4799–804.

95. Lewis MJ. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. *Organ Mund La Salud*. 2004;1–40.
96. Burk RD, Harari A, Chen Z. Human papillomavirus genome variants. *Virology* [Internet]. Elsevier; 2013;445(1-2):232–43. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.018>
97. Ritari J, Hultman J, Fingerroos R, Tarkkanen J, Pullat J, Paulin L, et al. Detection of human papillomaviruses by polymerase chain reaction and ligation reaction on universal microarray. *PLoS One*. 2012;7(3).
98. GENEWIZ, Inc. Sanger DNA Sequencing Services [Internet]. [citado 30 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.genewiz.com/public/DNA-sequencing-services.aspx>
99. Seegene. ANYPLEX II Detección de HPV28 [Internet]. 2013. Recuperado a partir de: <http://www.annardx.com/productos/images/productos/diagnostica/biologia-molecular/anyplexm-ii-hpv-28-detection-hp7s00x.pdf>
100. Lemey P, Salemi M, Vandamme A. *The Phylogenetic handbook* [Internet]. Second Edi. New York: Cambridge University Press; 2009. 1-751 p. Recuperado a partir de: www.cambridge.org/9780521877107
101. Saitou N, Nei M. The Neighbor-joining Method: A New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees. *Mol Biol Evol*. 1987;4(4):406–25.
102. Barry H. *Phylogenetic Trees Made Easy: A How-To Manual* [Internet]. Fourth. U.S.A.: Sinauer; 2011 [citado 10 de abril de 2015]. 1-282 p. Recuperado a partir de: <http://www.sinauer.com/phylogenetic-trees-made-easy-a-how-to-manual.html>
103. Giuliani L, Coletti A, Syrjänen K, Favalli C, Ciotti M. Comparison of DNA sequencing and Roche Linear array® in human papillomavirus (HPV) genotyping. *Anticancer Res*. 2006;26(5 B):3939–41.
104. Carvalho NDO, del Castillo DM, Perone C, Januário JN, de Melo VH, Filho GB. Comparison of HPV genotyping by type-specific PCR and sequencing. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(1):73–8.

105. Santos C, Muñoz N, Klug S, Almonte M, Guerrero I, Alvarez M, et al. HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru. *Br J Cancer*. 2001;85(7):966–71.
106. Access O. Human papillomavirus detection in women with and without human immunodeficiency virus infection in Colombia. 2014;1–10.
107. Estrade C, Sahli R. Comparison of seegene anyplex II HPV28 with the PGMY-CHUV assay for human papillomavirus genotyping. *J Clin Microbiol*. 2014;52(2):607–12.
108. Grada A, Weinbrecht K. Next-Generation Sequencing: Methodology and Application. *J Invest Dermatol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2013;133(8):e11–4. Recuperado a partir de: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.248>\npapers3://publication/doi/10.1038/jid.2013.248
109. IdtDNA. DNA Sequencing [Internet]. 2011. Recuperado a partir de: <https://www.idtdna.com/pages/docs/educational-resources/dna-sequencing.pdf>
110. Irwin NKJ. *Molecular Cloning*. Third. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. 1-2284 p.
111. Herráez Á. *Biología molecular e ingeniería genética*. Segunda. Madrid: Elsevier España, S.L.; 2012. 512 p.
112. What's so special about Next Generation sequencing? » Oxbridge Biotech Roundtable [Internet]. [citado 28 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.oxbridgebiotech.com/review/research-and-policy/whats-so-special-about-next-generation-sequencing/>
113. Dovichi NJ. DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* [Internet]. 1999;41:1–310. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10626769>
114. Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer - Specifications - Applied Biosystems [Internet]. [citado 30 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www6.appliedbiosystems.com/products/abi3730xlspecs.cfm>

115. Myllykangas S, Buenrostro J, Ji HP. Bioinformatics for High Throughput Sequencing. *Bioinforma High Throughput Seq* [Internet]. 2012;11–25. Recuperado a partir de: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-0782-9>
116. Chan KH, To KKW, Chan BWK, Li CPY, Chiu SS, Yuen KY, et al. Comparison of pyrosequencing, sanger sequencing, and melting curve analysis for detection of low-frequency macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* quasispecies in respiratory specimens. *J Clin Microbiol*. 2013;51(8):2592–8.
117. SiHa ATCC ® HTB-35™ *Homo sapiens cervix grade II, squamous c* [Internet]. [citado 8 de marzo de 2015]. Recuperado a partir de: <http://www.atcc.org/products/all/HTB-35.aspx#characteristics>