

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Virus del Papiloma Humano tipo 16 con una
delección de 2.4 kilobases**

Tesis que presenta

Cinthyia Alejandra Rodriguez Ortiz

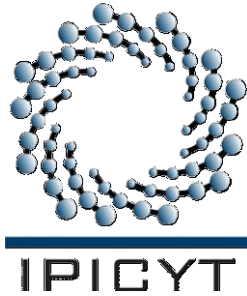
Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Rubén López Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., Agosto de 2013



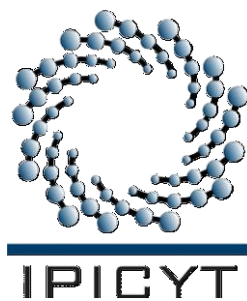
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Virus del Papiloma humano tipo 16 con una delección de 2.4 kilobases**” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Cintha Alejandra Rodriguez Ortiz** y aprobada el **22 de Agosto de 2013** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Rubén López Revilla
(Director de la tesis)

Dra. Lina Raquel Riego Ruíz
(Miembro del Comité Tutorial)

Dr. Samuel Lara González
(Miembro del Comité Tutorial)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 423784) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 114 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 18 días del mes de septiembre del año 2013, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dr. Samuel Lara González	Secretario	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Cinthyia Alejandra Rodríguez Ortiz

sobre la Tesis intitulada:

Virus del papiloma humano tipo 16 con una deleción de 2.4 kilobases

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla


El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 13:40 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 18 días del mes de septiembre de 2013.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



DEDICATORIAS

A mis padres, Patricia y Miguel, de quienes me siento muy orgullosa y con cuyo ejemplo he aprendido que todo logro es alcanzado a base de trabajo, constancia, esfuerzo, dedicación y amor.

A mi esposo, Arturo, quien a lo largo de esta experiencia me enseñó que la mayor virtud del amor es la paciencia.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén López Revilla por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por sus enseñanzas, por brindarme su tiempo, por su entera dedicación, por todas sus atenciones y sobre todo por ser un tutor fuera de serie.

A la bióloga Mireya Sánchez Garza con cuyo trabajo hace posible la realización de todos los proyectos, por su paciencia al enseñar, su gran entusiasmo, su compromiso y dedicación hacia cada uno de nosotros.

A mis amigos: Tere, Paty, Yazmín, Ángel y Oscar quienes llenaron de experiencias el tiempo dedicado a la realización de este trabajo; por su valiosa amistad, su ayuda, sus consejos y todo su apoyo.

A todos en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria por su compañerismo, por hacer del laboratorio un lugar agradable para aprender y trabajar; y por su valiosa amistad.

Al Dr. Luis Salazar y su equipo de trabajo por su compañerismo, por todos los días compartidos y su valiosa amistad en especial la de la Dra. Angélica Montoya.

A mis asesores la Dra. Lina Riego Ruiz y el Dr. Samuel Lara González por sus consejos y el tiempo invertido en la corrección del borrador.

Al M.C. Raúl de la Rosa Martínez por el apoyo en la tipificación de las muestras.

A Gloria por su apoyo en el material de trabajo.

Al IPICYT por las instalaciones prestadas.

Al CONACYT por la beca otorgada.

ÍNDICE

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	III
COPIA DEL ACTA DEL EXAMEN	IV
DEDICATORIAS	V
AGRADECIMIENTOS.....	VI
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
INTRODUCCIÓN.....	1
Virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino	1
Integración, progresión neoplásica y deleciones de VPH16	1
Partículas defectuosas interferentes	2
Amplificación por círculo rodante (RCA).....	3
Justificación y estrategia empleada	3
MATERIAL Y MÉTODOS	5
Obtención del DNA de los raspados cervicales y selección de los VPH-positivos	5
Clonación, purificación y minipreparación de DNA de pUC19	5
Amplificación por RCA de pUC19 en mezclas TempliPhi100 estándar y con desoxinucleótidos trifosfato adicionales	6
Genomas monoméricos de VPH16 obtenidos por restricción de los concatémeros generados por RCA.....	6
Amplificación de genomas monoméricos de VPH16 por PCR larga (LPCR) a partir de monómeros generados por restricción de concatémeros.....	7
RESULTADOS	10
Clonación, propagación y restricción de pUC19.....	10
Montaje de la RCA.....	10
Genoma de VPH16 de 5.5 kb detectado en un raspado cervical.....	10
La preamplificación por RCA aumenta la detección de infecciones múltiples	13
La preamplificación por RCA aumenta el rendimiento de genomas monoméricos de VPH16 generados por PCR larga (LPCR)	13
DISCUSIÓN.....	17
REFERENCIAS	20

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Tamaño y sitio de restricción único de los genomas circulares empleados	9
Tabla 2. Oligonucleótidos divergentes empleados para generar el genoma lineal completo de VPH16 mediante LPCR	9

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1. Mapa genómico de VPH16	4
Fig. 2. Amplificación por círculo rodante con hexámeros y DNA polimerasa de Phi29	4
Fig. 3. Localización del sitio de corte de <i>Bam</i> HI y de los oligonucleótidos divergentes para amplificar VPH16 mediante LPCR	9
Fig. 4. Miniprep de pUC19 intacta y restringida con <i>Bam</i> HI	12
Fig. 5. Rendimiento de los monómeros lineales de pUC19 obtenidos por restricción con <i>Bam</i> HI de los concatémeros generados en mezclas de RCA estándar y suplementadas con dNTPs 175 μ M o 345 μ M	12
Fig. 6. Rendimiento relativo de los monómeros lineales de pUC19 en mezclas de RCA suplementadas con concentraciones crecientes de dNTPs y tratadas con <i>Bam</i> HI	14
Fig. 7. Mezclas de RCA con DNA de ocho raspados cervicales VPH16-positivos tratadas con <i>Bam</i> HI	14
Fig. 8. Reproducibilidad de las bandas >10 kb y 5.5 kb obtenidos en mezclas de RCA con DNA del raspado cervical No. 6 suplementadas tratadas con <i>Bam</i> HI	15
Fig. 9. Tipificación de VPH mediante PCRMA del raspado cervical No. 6	15
Fig. 10. Genomas monoméricos lineales de VPH16 obtenidos por LPCR a partir de DNA de tres raspados cervicales intactos o preamplificados por RCA	16
Fig. 11. Reproducibilidad en la obtención de genomas monoméricos lineales de VPH16 por LPCR a partir de DNA del raspado cervical No. 10 preamplificado por RCA ..	16

RESUMEN

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO 16 CON UNA DELECIÓN GENÓMICA DE 2.4 KILOBASES

CONTEXTO. Los genomas de virus del papiloma humano (VPH) que infectan células epiteliales del cuello del útero se replican como episomas de DNA circular de cadena doble de ~7,900 pares de bases (pb). Al cuantificar la carga de los genes virales E2 y E6 nuestro laboratorio obtuvo evidencia indirecta de que en las infecciones del cérvix ocurren deleciones aleatorias del genoma de VPH tipo 16 (VPH16). Mediante amplificación por círculo rodante (RCA, *rolling circle amplification*) los episomas circulares pueden ser copiados como concatémeros lineales -moléculas de DNA constituidas por múltiples copias en tándem de los genomas monoméricos- y el análisis electroforético de los monómeros lineales liberados de los concatémeros por restricción con endonucleasas que reconocen un sitio único podrían distinguirse deleciones genómicas (i.e., copias de tamaño menor al silvestre unitario). Los concatémeros generados mediante RCA también podrían servir de molde para aumentar la amplificación de genomas lineales unitarios mediante PCR de largo alcance (LPCR) con parejas de oligonucleótidos iniciadores divergentes tipo-específicos. **MÉTODOS.** En este estudio probamos si la RCA seguida de restricción con *Bam* HI —para la cual hay un sitio único en el genoma de VPH16— o seguida de LPCR —empleando una pareja de oligos divergentes VPH16-específicos y localizados respectivamente al final de la región larga de control y al principio del ORF E6 del genoma de VPH16— permite identificar deleciones de VPH16 en raspados cervicales con infección única por VPH16 diagnosticados mediante PCR multiplex anidada (PCRMA) del oncogén viral E6. **RESULTADOS.** Después de restringir con *Bam* HI los concatémeros generados por RCA a partir del DNA de ocho raspados cervicales VPH16-positivos, sólo uno generó productos de amplificación con dos bandas, de 5.5 kilobases (kb) y >10 kb. Al emplearlas por separado en la PCRMA, la banda de 5.5 kb generó el amplicón esperado para VPH16 y la >10 kb los amplicones de VPH16 y VPH18. Dos de las tres mezclas de LPCR con concatémeros preamplificados por RCA —a partir de tres raspados cervicales adicionales VPH16-positivos— dieron la banda única de ~7.9 kb esperada para genomas de VPH16 completos. **CONCLUSIONES.** El raspado con la banda de 5.5 kb está infectado por una deleción de VPH16 de ~2.4 kb que no afecta el oncogén E6, el sitio *Bam* HI y la secuencia de los iniciadores divergentes VPH16-específicos. La banda >10 kb generada en la misma muestra contiene concatémeros de VPH16 y VPH18 no restringidos que identifican una infección por ambos tipos virales. Por lo tanto, la preamplificación del DNA de raspados cervicales VPH16-positivos mediante RCA 1) efectivamente distingue deleciones de los genomas de VPH16 y 2) aumenta la detección de infecciones múltiples; además 3) la RCA seguida de LPCR con iniciadores divergentes tipo-específicos también aumenta la detección de formas episomales de VPH16.

PALABRAS CLAVE: VPH16, Partículas defectuosas interferentes, Amplificación por círculo rodante, PCR de largo alcance, Infección única, Deleción genómica.

ABSTRACT

HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 WITH A 2.4 KILOBASE-GENOME DELETION

BACKGROUND. Human papillomavirus (HPV) genomes infecting epithelial cells of the uterine cervix replicate as double-stranded circular DNA episomes of ~7,900 base pairs. Quantifying the load of the E2 and E6 viral genes our laboratory obtained indirect evidence that random deletions of the HPV type 16 (HPV16) genome occur in cervical infections. By means of rolling circle amplification (RCA) circular episomes may be copied as concatemers—linear DNA molecules consisting of multiple tandem copies of monomeric genomes—and electrophoretic analysis of the linear monomeric genomes released from concatemers by restriction endonucleases recognizing a single site could distinguish genome deletions (i.e., monomer copies smaller than the wild type unitary genome). RCA generated concatemers could also serve as templates to increase amplification of linear unitary genomes by means of long-range PCR (LPCR) with divergent type-specific oligonucleotide primer pairs. **METHODS.** In this study we tested whether RCA followed by *Bam* HI restriction—for which there is a single site in the HPV16 genome—or followed by LPCR—using a pair of divergent HPV16-specific primer oligonucleotides located respectively at the end of the long control region and the beginning of the E6 ORF—could identify deletions in cervical scrapes with HPV16 single infection diagnosed by nested multiplex PCR (NMPCR) of the viral oncogene E6. **RESULTS.** After *Bam* HI restriction of RCA-generated concatemers from DNA of eight VPH16-positive cervical scrapes, only one generated amplification products and had two DNA bands, of 5.5 kilobase (kb) and >10 kb. Used separately in NMPCR the 5.5 kb band generated the expected HPV16 amplicon and the >10 kb band the HPV16 and HPV18 amplicons. Two of the three LPCR mixtures with RCA-preamplified concatemers—from three additional HPV16-positive cervical scrapes—generated the single DNA band of ~7.9 kb expected for complete HPV16 genomes. **CONCLUSIONS.** The cervical scrape with the 5.5 kb band is infected by a ~2.4 kb HPV16 deletion that does not affect the E6 oncogene, the *Bam* HI site and the HPV16-specific divergent primer sequences. The >10 kb band generated by the same sample corresponds to unrestricted HPV16 and HPV18 concatemers and identifies infection with both viral types. Therefore, RCA preamplification of DNA from HPV16-positive cervical scrapes 1) effectively distinguishes HPV16 genome deletions and 2) increases the detection of multiple infections; furthermore, 3) RCA followed by LPCR with divergent type-specific primers also increases detection of HPV16 episomes.

KEY WORDS: HPV16, Defective interfering particles, Rolling circle amplification, Long range PCR, Single infection, Genome deletion.

INTRODUCCIÓN

Virus del papiloma humano y cáncer cervicouterino

Los virus del papiloma humano (VPH) son los agentes infecciosos de transmisión sexual más prevalentes (Volkow et al. 2001) y numerosos estudios epidemiológicos han validado la hipótesis de que son necesarios para la transformación neoplásica del epitelio del cuello uterino (Bosch et al. 1995; Ho et al. 1995).

Entre los más de 100 genotipos de VPH identificados (de Villiers et al. 2004), los tipos VPH16 y VPH18 se asocian con mayor frecuencia al cáncer cervicouterino (CaCu) invasor en el mundo y VPH16 es responsable de alrededor del 50% de los casos (Bosch et al. 1995; Walboomers et al. 1999).

Integración, progresión neoplásica y deleciones de VPH16

Las células infectadas por VPH16 en las cuales el genoma viral está integrado al genoma celular tienen ventajas de crecimiento en comparación con las células en las cuales el genoma de VPH16 se encuentra en la forma episomal (Jeon et al. 1995). Durante el proceso de integración se interrumpen los genes E1-E2 (Arias-Pulido et al. 2006) y como el ORF de E2 codifica una proteína represora del promotor P97, en las células con genoma viral integrado se sobreexpresan las oncoproteínas E6 y E7 (Romanczuk et al. 1990). También se ha reportado que la frecuencia de integración del genoma viral es proporcional a la severidad de las lesiones neoplásicas (Cullen et al. 1991).

Estos hallazgos generaron un modelo que correlaciona la integración del genoma viral y la progresión neoplásica con el cociente E2/E6 (i.e., el número de copias del gen E2 dividido entre el número de copias del gen E6) (Nagao et al. 2002). En este modelo los dos valores extremos del cociente E2/E6 son 1 (cuando el genoma viral se encuentra exclusivamente en la forma episomal, hay el mismo número de copias de ambos genes virales y no hay progresión neoplásica) y cero (cuando se han perdido todas las copias del gen E2 por integración del genoma viral con la consecuente interrupción y pérdida de la actividad represora de los oncogenes virales en las lesiones cancerosas más avanzadas). El modelo supone implícitamente que no hay deleciones del oncogén E6, que debe estar presente y expresarse en todas las células neoplásicas.

Recientemente Hernández-Arteaga (2010) cuantificó en nuestro laboratorio la carga de los genes E2 y E6 de VPH16 (i.e., el número de copias por ng de DNA)

mediante qPCR en raspados cervicales de 35 mujeres con lesiones displásicas y cancerosas e infección única por VPH16. Inesperadamente encontró que el valor máximo del cociente E2/E6 no fue el esperado de 1 sino 626 (¡equivalente a 626 copias de E2 por cada copia de E6!) y que los valores del cociente tuvieron una distribución gaussiana (i.e., aleatoria) con un promedio cercano a 10. Estos resultados sugirieron por primera vez que durante la infección natural del epitelio del cérvix por VPH16 ocurren deleciones aleatorias del genoma viral que afectan no sólo al gen E2 sino también y principalmente al oncogén E6.

Partículas defectuosas interferentes

Las partículas defectuosas interferentes (DIP, siglas de *defective interfering particles*) son viriones con genomas incompletos que carecen de uno o más genes esenciales para llevar a cabo el ciclo completo de replicación viral, por lo cual requieren ser complementadas por genomas completos del mismo virus o por genes celulares o virales auxiliares ('helper') que suplan las funciones de los genes faltantes (Thompson and Yin 2010).

La aparición y propagación de DIP es favorecida cuando se propagan lisados virales in vitro mediante infecciones sucesivas con altas multiplicidades de infección, i.e., con un exceso de partículas virales en relación con el número de células infectadas (Rowe and Baum 1964). El predominio de los genomas virales deletados se debe a que los genomas incompletos pueden replicarse en menor tiempo que los completos y éstos a su vez complementan las funciones faltantes en los genomas deletados (MacLachlan and Dubovi 2011).

La presencia de ciertas partículas defectuosas interfiere con la infección, replicación y liberación de partículas virales completas (Cabrerizo et al. 2002). Sin embargo, cuando se desconoce la extensión de las deleciones y las funciones virales afectadas tampoco pueden predecirse los efectos que un tipo dado de partículas defectuosas pudiera tener en las infecciones naturales de los virus animales (Stauffer Thompson et al. 2009).

Si en las infecciones naturales del cérvix ocurriesen deleciones de las formas episomales del genoma de VPH16 y éstas fuesen encapsidadas, podrían generarse DIP cuya proporción podría aumentar en infecciones subsecuentes y afectar la replicación viral, la progresión neoplásica y la inmunidad contra VPH16 (Hernández-Arteaga 2010).

Amplificación por círculo rodante (RCA)

Los VPH poseen un genoma circular de DNA de cadena doble de ~7,900 pares de bases (pb) asociado a histonas (Favre 1975). (Ver Fig. 1).

Los genomas virales y los plásmidos de DNA circular de cadena doble pueden ser replicados eficientemente in vitro mediante la amplificación isotérmica (i.e., incubándolos a una sola temperatura, sin necesidad de termociclador) por el mecanismo de círculo rodante (RCA, siglas de *rolling circle amplification*) con DNA polimerasa del fago 29 (Phi29), desoxinucleótidos trifosfato y hexanucleótidos aleatorios que inician nuevas cadenas de DNA en sitios múltiples de cada círculo de cadena sencilla que sirve de molde inicial, las cuales son extendidas para dar lugar a concatémeros formados por unidades de monómeros de secuencias genómicas completas repetidas en tándem (Stevens et al. 2010) (Ver Fig. 2).

La mezcla estándar del kit para RCA amplifica concatémeros a partir de las formas circulares ('episomales') de VPH16 y ha sido optimizada para maximizar el rendimiento de los monómeros lineales mediante suplementación con desoxinucleótidos trifostato (dNTPs) (Rector et al. 2004).

Justificación y estrategia empleada

Si efectivamente ocurren deleciones aleatorias del genoma de VPH16, en las infecciones naturales del cérvix podrían ser generadas DIP capaces de afectar la replicación, la oncogenicidad y la inmunidad antiviral, como ocurre con otros virus animales (Roux et al. 1991) y el cociente E2/E6 debería ser descartado como marcador de la integración del genoma viral y de la progresión neoplásica.

La obtención de monómeros lineales con longitud menor a 7.9 kb a partir de los concatémeros generados por RCA de las formas episomales presentes en raspados cervicales VPH16-positivos constituiría una evidencia estructural confiable de la ocurrencia de deleciones del genoma viral en las infecciones naturales del cérvix y sentaría las bases para caracterizarlas más a fondo, explorando cómo se producen y sus efectos sobre la replicación viral y la oncogenicidad.

El propósito de este trabajo fue obtener evidencia estructural de la ocurrencia de deleciones del genoma de VPH16 (i.e., genomas virales incompletos) a través de la determinación electroforética del tamaño de los monómeros lineales generados por restricción de los concatémeros obtenidos mediante RCA a partir de las formas episomales del DNA presentes en raspados cervicales VPH16-positivos.

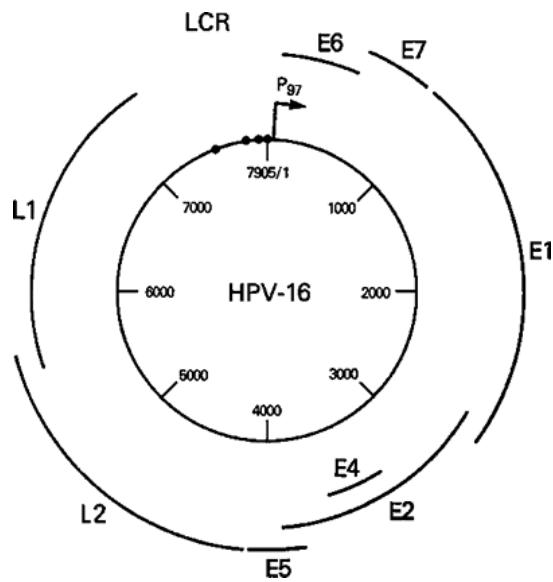


Fig. 1. Mapa genómico de VPH16

Dentro del mapa circular interno están anotados los números que indican la posición de los nucleótidos y por fuera se indican los marcos de lectura abierta (E1 a E7, L1 y L2). Se muestra el único promotor para VPH16 (P97). La región larga de control (LCR) contiene los elementos que regulan la transcripción y la replicación. Los puntos negros representan los cuatro sitios de unión de E2. Tomado de Howley et al.(2011).

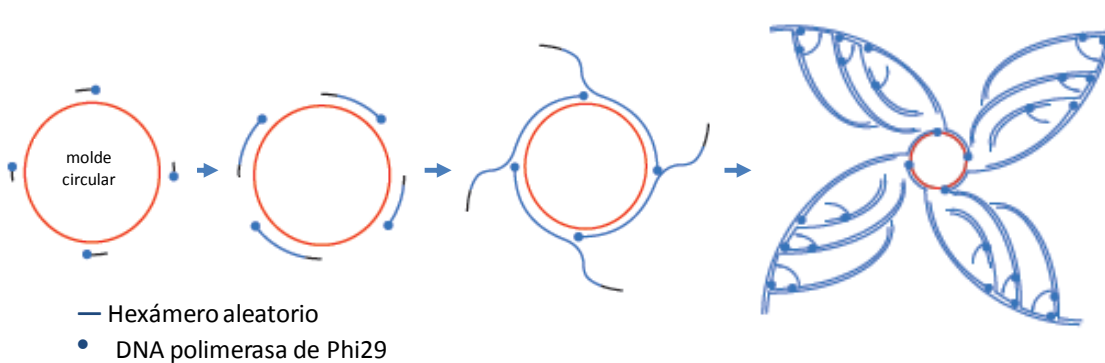


Fig. 2. Amplificación por círculo rodante con hexámeros y DNA polimerasa de Phi29

Los iniciadores hexaméricos aleatorios se unen al molde circular en sitios múltiples. La DNA polimerasa de Phi29 extiende cada iniciador. La DNA polimerasa desplaza la cadena cuando alcanza un iniciador extendido corriente abajo. La cadena desplazada se vuelve sencilla, disponible para ser extendida por más iniciadores. La continuación del proceso resulta en amplificación isotérmica exponencial (GE-Healthcare-Life-Sciences 2013).

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del DNA de los raspados cervicales y selección de los VPH-positivos

El DNA de los 11 raspados cervicales incluidos en este trabajo con infecciones únicas por VPH16 proviene del banco de raspados cervicales de nuestro laboratorio (de la Rosa 2013). El diagnóstico fue realizado con la reacción de polimerización en cadena multiplex anidada (PCRMA) del oncogén viral E6 (Sotlar et al. 2004). Este método emplea oligonucleótidos degenerados en la primera mezcla de reacción y oligonucleótidos tipo-específicos en los cocteles respectivos de las cuatro mezclas de reacción anidada que generan amplicones de tamaño conocido para identificar 19 tipos de VPH de alto y bajo riesgo. El primer coctel de las mezclas anidadas incluye los oligonucleótidos tipo-específicos para VPH16 y VPH18.

Clonación, purificación y minipreparación de DNA de pUC19

Para obtener una clona transformante que porte el plásmido pUC19 circularizado utilicé *Escherichia coli* TOP10 (F- *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74* *recA1* *araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU* *galK* *rpsL* (StrR) *endA1* *nupG*). Electroporé una mezcla con 50 μ L de una suspensión de células de *E. coli* TOP10 y 1 μ L de pUC19 circular del kit TempliPhi100 (Invitrogen). Incubé la mezcla electroporada 90 min a 37°C, la centrifugué, suspendí la pastilla celular en caldo LB e inoculé 50 μ L de la suspensión en cajas de agar LB suplementadas con carbenicilina (Cb) IPTG-X Gal.

Obtuve la clona RO101 (Amp^R Lac+) mediante dos pases sucesivos por estría de una colonia azul, seleccionada por su resistencia a ampicilina y capacidad de utilizar lactosa en agar selectivo (LB IPTG X-Gal).

Propagué la asada de una colonia aislada de RO101 a 37°C con agitación durante toda la noche (o/n) en un tubo con 5 mL de caldo LB-Cb; por lisis alcalina purifiqué pUC19 vacío (Ehrt and Schnappinger 2003) y determiné la absorbencia a 260 nm (A_{260}) y el cociente A_{260}/A_{280} en el espectrofotómetro Epoch (Biotek). A 2 μ L de DNA de pUC19 puro añadí 10 U de *Bam* HI (Invitrogen) e incubé la mezcla 12 h en un termoblock a 37°C. Luego apliqué 10 μ L de la mezcla de digestión en un gel de TAE-agarosa al 1% que corrí

a 100 V por 1 h. Posteriormente teñí 20 min con bromuro de etidio (1 mg/mL) y visualicé el gel por transiluminación UV en el fotodocumentador ChemiDoc EQ.

Amplificación por RCA de pUC19 en mezclas TempliPhi100 estándar y con desoxinucleótidos trifosfato adicionales

Realicé la amplificación por RCA con el kit TempliPhi100 -que utiliza la DNA polimerasa del bacteriófago 29 (Phi29) y hexámeros aleatorios como iniciadores- para obtener concatémeros lineales a partir de genomas circulares (Invitrogen).

En un termociclador Techne (Touchgene Gradient) incubé mezclas de RCA de 11.2 µL -estándar y suplementadas con desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 175 o 345 µM- que contenían 0.2 µL de DNA polimerasa del bacteriófago 29 y 0.5 µL de pUC19 para llevar a cabo sucesivamente la desnaturalización del DNA (95°C/3 min), la amplificación (30°C/18 h) y la inactivación de la enzima (65°C/10 min).

Llevé a cabo la restricción de 2 µL de cada mezcla de RCA que contenía los concatémeros de pUC19 mediante incubación con 10 U de *Bam* HI (Invitrogen) por 12 h en un termoblock a 37°C (Tabla 1). Luego analicé 10 µL de las mezclas tratadas (con monómeros lineales de pUC19) en geles de TAE-agarosa al 1% que corrí a 100 V por 1 h. Posteriormente teñí por 20 min con bromuro de etidio (1 mg/mL) y visualicé el gel por transiluminación UV en el fotodocumentador ChemiDoc EQ. Cuantifiqué los pixeles de las bandas con QuantityOne y grafiqué y calculé el rendimiento relativo de concatémeros (Rector et al. 2004).

Para maximizar el rendimiento con pUC19, en el termociclador probé luego mezclas de RCA de 12.2 µL con mayores suplementos de dNTPs (492, 656 y 820 µM) en las condiciones descritas en el párrafo anterior.

Genomas monoméricos de VPH16 obtenidos por restricción de los concatémeros generados por RCA

En el termociclador incubé ocho mezclas de RCA de 12.2 µL con DNA de VPH16 suplementadas con dNTPs 492 µM para amplificar concatémeros en las condiciones descritas para pUC19.

Para obtener preparaciones de monómeros de VPH16, a 2 µL de cada mezcla de RCA que contenía concatémeros de VPH16 añadí 10 U de *Bam* HI (Invitrogen) mediante incubación por 12 h en un termoblock a 37°C (Fig. 3, Tabla 1). Luego hice el análisis

electroforético de las ocho mezclas de digestión en un gel de TAE-agarosa al 1% que corrí a 100 V por 1 h.

Escogí el DNA del único raspado que generó monómeros de VPH16 y lo reamplifiqué por triplicado en mezclas de RCA de 12.2 μL suplementadas con dNTPs 492 μM . Preparé mezclas de restricción con 2 ó 10 μL de cada mezcla de RCA y 10 ó 15 U de *Bam* HI que incubé por 12 h en un termoblock a 37°C e hice el análisis electroforético de 10 y 40 μL de las mezclas de digestión en un gel preparativo de TAE-agarosa al 1% que corrí a 100 V por 1 h.

Al término de la corrida corté el gel en sentido longitudinal (i.e., del origen al frente de la electroforesis) con una hoja nueva de bisturí para separar los carriles de los pozos con 10 μL y 40 μL . Teñí con bromuro de etidio únicamente el carril con 10 μL y en el fotodocumentador medí la migración de la banda de interés. Luego tomé la misma medida en la otra parte, corté la región con la banda del tamaño esperado sin exponerla a la luz UV y purifiqué el DNA con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA de las bandas purificadas fue nuevamente tipificado mediante PCRMA y los productos de amplificación analizados en un gel de SB-agarosa al 2%.

Amplificación de genomas monoméricos de VPH16 por PCR larga (LPCR) a partir de monómeros generados por restricción de concatémeros

Las mezclas de PCR de largo alcance (LPCR) contenían la pareja de oligonucleótidos divergentes VPH16-F/R (Fig. 3, Tabla 2) diseñados previamente en el laboratorio (Magaña-León 2009). En un termociclador Techne (Touchgene Gradient) coloqué tubos con mezclas de 50 μL que contenían $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1.25 mM, dNTP's 0.2 mM c/u, mezcla de oligonucleótidos 0.4 μM c/u, 1 U de DNA polimerasa rTth (Applied Biosystems) y 2 μL de DNA molde purificado de tres muestras de raspados cervicales tipificadas en el laboratorio como VPH16 con concentraciones mayores a 150 ng/ μL . Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 15 seg, seguida de 40 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94°C por 15 seg, annealing a 59.6°C por 1 min, extensión a 68°C por 10 min; extensión final a 72°C por 10 min. Hice mezclas paralelas de LPCR en las mismas condiciones pero con 2 μL de mezclas de RCA suplementadas con dNTPs 492 μM que contenían concatémeros de VPH16 como molde. Analicé por electroforesis 10 μL de cada mezcla en un gel TAE-agarosa al 1%, corrido a 100 V por 1 h. Teñí con bromuro de etidio (1 mg/mL) por 20 min, visualicé el gel en el

fotodocumentador ChemiDoc EQ y comparé los genomas monoméricos lineales de VPH16 obtenidos en ambas mezclas.

Escogí el DNA de una de las mezclas antes analizada e hice mezclas de RCA por triplicado de 12.2 μ L suplementadas con dNTPs 492 μ M para obtener concatémeros de VPH16. Posteriormente hice mezclas de LPCR de 50 μ L que contenían $\text{Mg}(\text{OAc})_2$ 1.25 mM, dNTP's 0.2 mM c/u, mezcla de oligonucleótidos 0.4 μ M c/u, 1 U de DNA polimerasa rTth (Applied Biosystems) y 5 μ L de DNA preamplificado por RCA. Amplifiqué las muestras en un termociclador Techne en las condiciones descritas para monómeros lineales de VPH16 e hice el análisis electroforético en un gel de TAE-agarosa al 1% que corrí a 100 V por 1 h.

Tabla 1. Tamaño y sitio de restricción único de los genomas circulares empleados

DNA	pb	Fuente	Endonucleasa	Sitio de corte único
pUC19 ^a	2686	Mimiprep	<i>Bam</i> HI ^{a,b}	G'GATCC
VPH16 ^b	7904	Raspado cervical		

^a New-England-BioLabs (2013).

^b Durst et al.(1985).

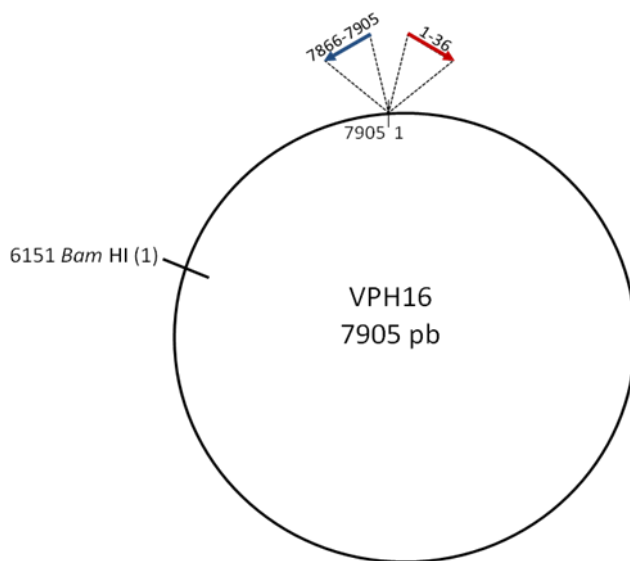


Fig. 3. Localización del sitio de corte de *Bam* HI y de los oligonucleótidos divergentes para amplificar VPH16 mediante LPCR

Los oligonucleótidos divergentes delimitan los extremos del genoma de VPH16 y se indican con colores diferentes (Reverse azul, Forward rojo). El Reverse (nt 7866-7905) se localiza al final de la región LCR y el Forward (nt 1-36) al principio del ORF de E6. El único sitio de corte de *Bam* HI se localiza en el ORF de L1. Imagen diseñada con Primer Premier 5.0 (Premier-Biosoft 2013).

Tabla 2. Oligonucleótidos divergentes empleados para generar el genoma lineal completo de VPH16 mediante LPCR

Nombre	Secuencia	Tamaño
VPH16-F	5' ACTACAATAATTCATGTATAAACTAAGGGCGTAAC	36 nt
VPH16-R	5' TTAGTATTATTATATAAGTTGCTTGTAATGTGTAACCCA	40 nt

^a Diseñados con el software Primer Premier 5.0 (Premier-Biosoft 2013).

RESULTADOS

Clonación, propagación y restricción de pUC19

Para emplear el pUC19 del kit TempliPhi100 en la RCA como molde y control para la restricción de concatémeros me propuse obtener transformantes de *E. coli* TOP 10 por electroporación.

A partir de la clona transformante RO101 (Amp^R Lac+) hice una minipreparación por lisis alcalina, cuyo DNA tuvo una $A_{260}/A_{280} = 1.9$, 407 ng/ μ L y rindió 2.04 ng/mL de cultivo. Al analizar el electroferograma de pUC19 purificado, en el carril con la miniprep intacta observé una banda con tamaño aparente de 1,900 pb (pUC19 superenrollado) mientras que en el carril con la preparación restringida con *Bam* HI observé la banda esperada de 2,686 pb (Fig. 4).

Montaje de la RCA

La digestión con *Bam* HI de mezclas de RCA TempliPhi100 estándar y suplementadas con dNTPs 175 μ M (Δ 175) y 345 μ M (Δ 345) con pUC19 circular vacío generaron el amplicón esperado de 2,686 pb (Fig. 5A). La intensidad de la banda de pUC19 linearizado fue proporcional a la cantidad de dNTPs adicionales: mezcla estándar 4 pixeles; Δ 175, 7 pixeles; Δ 345, 15 pixeles (Fig. 5B).

La digestión con *Bam* HI de las mezclas de RCA con pUC19 circular vacío suplementadas con dNTPs 492, 656 y 820 μ M generó el amplicón esperado de 2,686 pb. La intensidad de la banda de pUC19 linearizado fue máxima con la mezcla Δ 492 (Fig. 6). Con estos resultados decidí suplementar en adelante las mezclas estándar de RCA con dNTPs 492 μ M para amplificar las formas episomales de VPH16 que pudieran estar presentes en los raspados cervicales.

Genoma de VPH16 de 5.5 kb detectado en un raspado cervical

Para obtener monómeros lineales de VPH16 restringí con *Bam* HI mezclas de RCA que contenían DNA de raspados cervicales de ocho mujeres con infecciones únicas por VPH16 diagnosticadas previamente mediante PCRMA.

El análisis electroforético mostró que sólo una de las ocho mezclas de RCA restringida con *Bam* HI tenía genomas monoméricos lineales de VPH16 detectables, pero su tamaño no era el esperado de 7.9 kb sino de 5.5 kb (Fig. 7).

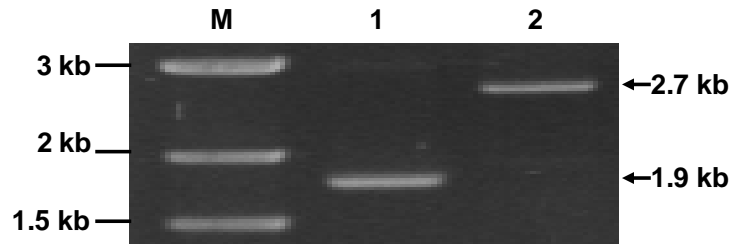


Fig. 4. Miniprep de pUC19 intacta y restringida con *Bam* HI

Miniprep de una clona candidato (derivada de un cultivo de *E. coli* TOP10 electroporado con pUC19; 2686pb y restricción del plásmido purificado. M, escalera 1 kb. Carril 1, lisado de colonia aislada (pUC19). Carril 2, restricción de pUC19 con *Bam* HI.

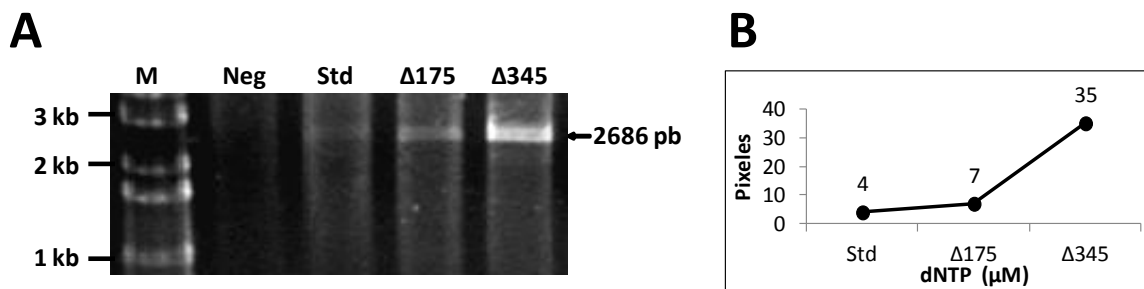


Fig. 5. Rendimiento de los monómeros lineales de pUC19 obtenidos por restricción con *Bam* HI de los concatémeros generados en mezclas de RCA estándar y suplementadas con dNTPs 175 μM o 345 μM

(A) Electroferograma de las mezclas de RCA -estándar (Std) y suplementadas con desoxinucleótidos trifosfato 175 μM (Δ175) y 345 μM (Δ345)- tratadas con *Bam* HI; M, escalera de 1 kb, Neg, control negativo (sin DNA). (B) Intensidad de las bandas en las mezclas estándar y suplementadas con dNTPs.

Para verificar este hallazgo restringí con *Bam* HI una mezcla de RCA preparada con DNA del mismo raspado cervical por triplicado. El análisis electroforético de la muestra analizada por triplicado dio el mismo patrón: una banda difusa de migración de tamaño aparente mayor a 10 kb (>10 kb) y una banda nítida de 5.5 kb (Fig. 8).

La preamplificación por RCA aumenta la detección de infecciones múltiples

Para ver si las bandas de 5.5 kb y >10 kb contenían secuencias de VPH16 las purifiqué para tipificarlas por duplicado nuevamente mediante PCRMA. La banda de 5.5 kb generó el amplicón de 457 pb característico de VPH16, mientras que la banda >10kb generó tanto el amplicón de 457 pb como el de 322 pb, característico de VPH18 (Fig. 9B).

Como la PCRMA con ambas bandas puras (5.5 kb y >10 kb) confirmó la infección por VPH16 en tanto que con la banda >10 kb diagnosticó una infección adicional por VPH18, concluí que la preamplificación por RCA aumenta la detección de infecciones múltiples por VPH.

La preamplificación por RCA aumenta el rendimiento de genomas monoméricos de VPH16 generados por PCR larga (LPCR)

Para ver si la preamplificación por RCA seguida de LPCR aumenta la sensibilidad para la detección de VPH16 en los raspados cervicales, comparé la obtención de genomas monoméricos con LPCR a partir del DNA de tres raspados cervicales no preamplificados o preamplificados por RCA.

El análisis electroforético no mostró la banda de 7.9 kb esperada para VPH16 en ninguna de las muestras no preamplificadas pero sí en dos de las tres mezclas preamplificadas (Fig. 10).

Confirmé este resultado en mezclas de LPCR con DNA preamplificado por RCA de una de las tres muestras anteriores. El análisis electroforético de las mezclas corridas por triplicado con el mismo DNA de VPH16 preamplificado por RCA dio una sola banda de 7.9 kb (Fig. 11).

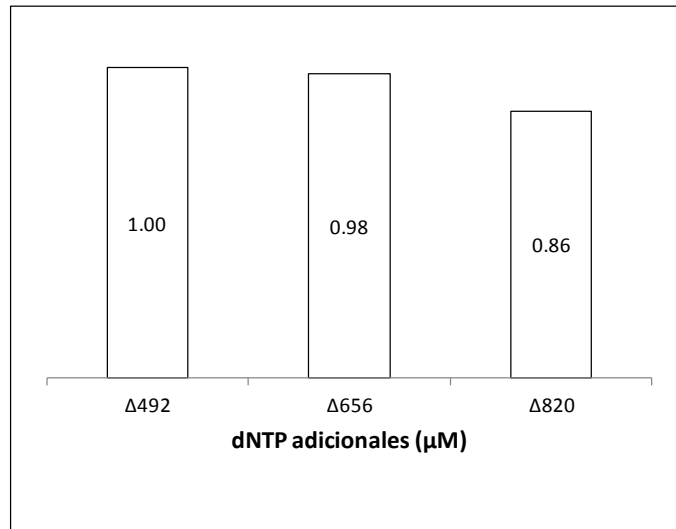


Fig. 6. Rendimiento relativo de los monómeros lineales de pUC19 en mezclas de RCA suplementadas con concentraciones crecientes de dNTPs y tratadas con *Bam* HI

Las barras indican la intensidad relativa (píxeles) en mezclas de RCA suplementadas con desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 492, 656 y 820 μM. La intensidad fue normalizada (1.00) con la mezcla suplementada con dNTPs 492 μM.

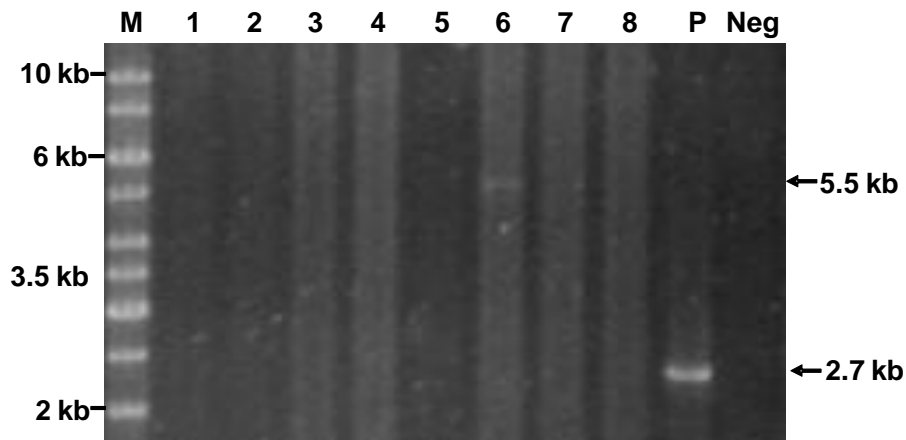


Fig. 7. Mezclas de RCA con DNA de ocho raspados cervicales VPH16-positivos tratadas con *Bam* HI

M, escalera 1kb. Carril 1, mezcla de RCA con raspado cervical No 1. Carril 2, mezcla de RCA con raspado cervical No.2. Carril 3, mezcla de RCA con raspado cervical No. 3. Carril 4, mezcla de RCA con raspado cervical No. 4. Carril 5, mezcla de RCA con raspado cervical No. 5. Carril 6, mezcla de RCA con raspado cervical No. 6. Carril 7, mezcla de RCA con raspado cervical No. 7. Carril 8, mezcla de RCA con raspado cervical No.8. P, mezcla de RCA con pUC19, control positivo. Neg, blanco (sin DNA), control negativo. Nótese la banda nítida de 5.5 kb en el carril 6 del raspado cervical No. 6.

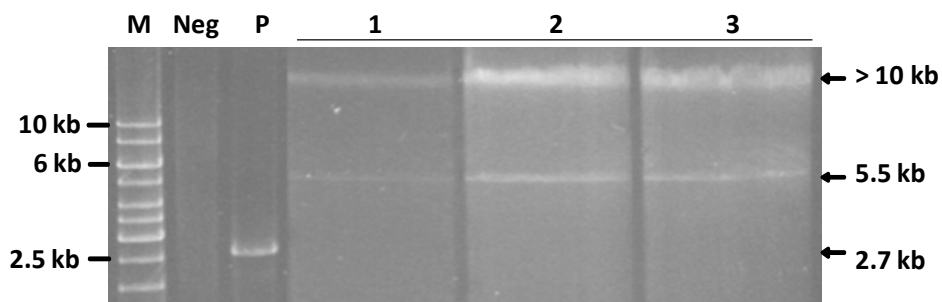


Fig. 8. Reproducibilidad de las bandas >10 kb y 5.5 kb obtenidos en mezclas de RCA con DNA del raspado cervical No. 6 suplementadas tratadas con *Bam* HI

Las mezclas de RCA fueron suplementadas con dNTPs 492 μ M y seguidas de restricción con *Bam* HI. M escalera 1 kb. Neg, blanco (sin DNA). P, control positivo (pUC 19). Carriles 1-3, mezclas de RCA con DNA del raspado cervical No. 6 por triplicado.

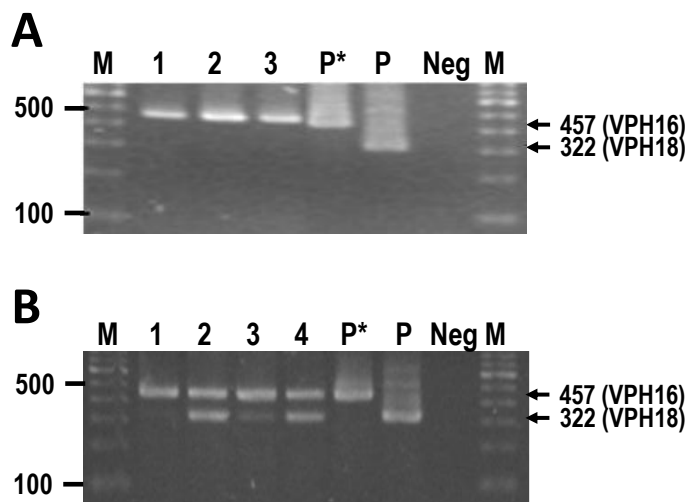


Fig. 9. Tipificación de VPH mediante PCRMA del raspado cervical No. 6

(A) Tipificación de VPH previa mediante PCRMA, mezclas por triplicado. M, escalera de 100 pb. Carril 1-3, tipificación hecha por triplicado de DNA purificado de raspado cervical. P*, Control positivo tipo VPH16; células SiHa. P, Control positivo VPH-18; células HeLa. Neg, blanco (sin DNA). (B) Tipificación de VPH mediante PCRMA, por duplicado a partir de las bandas de 10 y 5.5 kb preamplificadas en mezclas de RCA suplementadas con dNTPs 492 μ M. M, Escalera de 100 pb. Carril 1, DNA purificado de banda de migración rápida. Carril 2, DNA purificado de banda de migración lenta. Carril 3, DNA purificado de banda de migración rápida. Carril 4, DNA purificado de banda de migración lenta. P*, Control positivo tipo VPH16, células SiHa. P, Control positivo VPH-18, células HeLa. Neg, blanco (sin DNA).

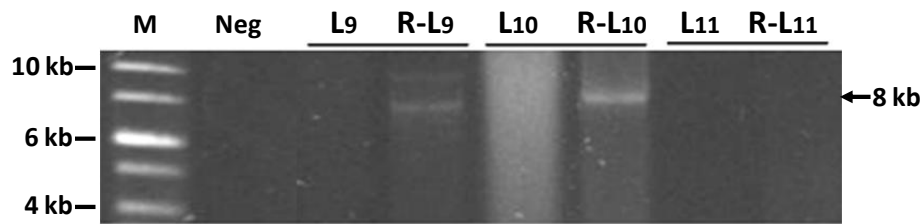


Fig. 10. Genomas monoméricos lineales de VPH16 obtenidos por LPCR a partir de DNA de tres raspados cervicales intactos o preamplificados por RCA

M, Escalera de 1kb. Neg, Mezcla blanco, sin DNA. L₉, LPCR con DNA del raspado cervical No. 9. R-L₉, LPCR con DNA de raspado cervical No. 9 preamplificado por RCA. L₁₀, LPCR con DNA del raspado cervical No. 10. R-L₁₀, LPCR con DNA de raspado cervical No. 10 preamplificado por RCA. L₁₁, LPCR con DNA del raspado cervical No. 11. R-L₁₁, LPCR con DNA de raspado cervical No. 10 preamplificado por RCA.

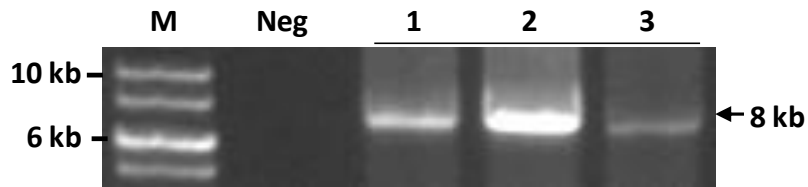


Fig. 11. Reproducibilidad en la obtención de genomas monoméricos lineales de VPH16 por LPCR a partir de DNA del raspado cervical No. 10 preamplificado por RCA

M, Escalera de 1 kb. Neg, blanco (sin DNA). Carril1-3, Mezclas de LPCR con DNA del raspado cervical No. 10 preamplificados por RCA.

DISCUSIÓN

Este trabajo permitió obtener la evidencia estructural esperada que apoya la ocurrencia de deleciones del genoma de VPH16 en las infecciones naturales del cérvix.

Con la propagación y purificación del DNA plasmídico de *E. coli* RO101, transformada por pUC19, pude caracterizar la preparación del plásmido intacto y tratado con *Bam* HI. La preparación intacta (con la forma circular superenrollada de pUC19) tuvo un tamaño aparente de 1.9 kb, que la restricción con *Bam* HI cambió al tamaño esperado de 2.7 kb para la forma lineal. Así confirmé la idoneidad de pUC19 para controlar el corte del sitio único de *Bam* HI de los concatémeros de VPH16 que esperaba generar en las mezclas de RCA a partir de las formas episomales del genoma de VPH16 presentes en los raspados cervicales.

Validé que las mezclas de RCA con la DNA polimerasa Phi29 efectivamente generan concatémeros a partir del DNA circular de pUC19 que al ser restringidos con *Bam* HI generan la banda del tamaño esperado para los monómeros lineales del genoma completo de pUC19 (Dean et al. 2001; Rector et al. 2004).

El rendimiento de los monómeros lineales de pUC19 en mezclas de RCA fue máximo con el suplemento de dNTPs 492 μ M, similar al recomendado para maximizar el rendimiento de las formas episomales de VPH16 (Rector et al. 2004).

Estos experimentos preliminares sentaron las bases para amplificar los concatémeros a partir de las formas episomales de los genomas virales presentes en los raspados cervicales con infección única por VPH16 en mezclas de RCA estándar suplementadas con dNTPs 492 μ M y luego tratadas con *Bam* HI (mezclas RCA-*Bam* HI).

Al ensayar ocho raspados VPH16-positivos en mezclas RCA-*Bam* HI solamente uno generó una banda visible de monómeros lineales de 5.5 kb. Este resultado se repitió en un experimento adicional con la misma muestra por triplicado, que después de ser tratada con *Bam* HI mostró una banda difusa de DNA de mayor tamaño aparente (> 10 kb) y otra nítida de 5.5 kb. Las siete muestras restantes que no dieron bandas de monómeros visibles probablemente tenían cargas de VPH16 insuficientes para ser detectadas de esta manera.

La PCRMA a partir de ambas bandas purificadas confirmó la presencia de formas episomales del genoma de VPH16 con una deleción de ~2.4 kb. En contraste, la PCRMA con la banda >10 kb amplificó tanto la banda esperada para VPH16 como,

inesperadamente, la banda característica de VPH18. Estos resultados indican que en el raspado correspondiente están presentes, de manera exclusiva o predominante, formas episomales del genoma de VPH16 de 5.5 kb (i.e., con una delección de ~2.4 kb), pero además hay una infección adicional por formas episomales de VPH18, no detectada inicialmente. Este último hallazgo sugiere que la preamplificación por RCA aumenta la sensibilidad para la detección de infecciones múltiples por VPH, especialmente cuando sea baja la carga de las formas episomales de un tipo viral (Schmitt et al. 2010) puesto que la amplificación por RCA es independiente de la secuencia de las formas episomales presentes en las muestras problema (Meiring et al. 2012).

La detección de las formas episomales de VPH16 también aumentó mediante la preamplificación de concatémeros de VPH16 por RCA a partir de raspados cervicales seguida de amplificación por LPCR con la pareja de oligonucleótidos divergentes tipo-específicos diseñados en nuestro laboratorio (Magaña-León 2009). Esta conclusión es inferida porque la preamplificación por RCA seguida de LPCR generó bandas de 7.9 kb en dos de tres mezclas con DNA de raspados VPH16-positivos; el método tiene la ventaja de no requerir *Bam* HI para obtener monómeros lineales y confirma que el uso de primers tipo-específicos aumenta significativamente el rango de detección de VPH (Schmitt et al. 2010).

La primera evidencia sobre la ocurrencia de delecciones de VPH16 fue obtenida en nuestro laboratorio a través de la cuantificación de la carga de los genes E2 y E6 mediante PCR cuantitativa y el cálculo del cociente E2/E6 en 35 raspados cervicales (Hernández-Arteaga 2010). La distribución gaussiana de los valores del cociente E2/E6 sugirió que en las infecciones naturales del cérvix parecen ocurrir delecciones aleatorias de ambos genes virales, por lo cual los genomas virales deletados podrían, como se sabe que ocurre con otros virus, generar partículas defectuosas interferentes que afecten la replicación viral, la progresión neoplásica y la inmunidad antiviral (Roux et al. 1991).

Los avances teóricos y metodológicos de este trabajo sientan las bases para poder analizar un número suficiente de raspados cervicales que permita mapear las delecciones del genoma de VPH16 en las infecciones naturales del cérvix y así abrir la investigación sobre sus efectos sobre la replicación, la patogenicidad viral y las DIP de los VPH.

La ocurrencia de delecciones del genoma viral en infecciones únicas por VPH16 apoyada por este trabajo descarta al cociente E2/E6 como marcador molecular confiable de la integración del genoma viral y la progresión neoplásica apoyado por (Arias-Pulido et al. 2006; Cricca et al. 2007).

Nuestros resultados no explican el mecanismo de las deleciones, que podrían deberse a la recombinación de secuencias homólogas suficientemente espaciadas en el genoma de VPH16, como sucede en ciertos virus circulares de DNA de plantas (Giri et al. 2012).

Las deleciones de VPH16 podrían servir para desarrollar vacunas futuras basadas en DIP que estimulen la maduración de células dendríticas y aumenten la respuesta inmunitaria adaptativa (Yount et al. 2006).

Variaciones en la localización y extensión de las deleciones del genoma de VPH16 generarían diversas clases de DIP con efectos diferentes sobre la replicación viral, la oncogenicidad y la inmunidad antiviral. Las coinfecciones con diversos genotipos de VPH con genomas completos o deletados podrían estar implicadas en eventos de complementación genética intratípica e intertípica.

La reproducibilidad en la generación de monómeros lineales de VPH16 de 5.5 kb mediante RCA a partir de un raspado cervical y de monómeros lineales de 7.9 kb a partir de dos de tres raspados mediante RCA-LPCR demostró en el primer caso la ocurrencia de una deleción de 2.4 kb y en los dos casos siguientes la presencia de genomas virales completos.

La baja carga viral —i.e., el escaso número de moléculas de genomas virales en el DNA de los raspados cervicales— podría ser la causa de que el ensayo de RCA no hubiese generado genomas monoméricos lineales detectables en todos los casos. Este obstáculo podría salvarse si reducimos el umbral de carga mínima apropiada para la detección de los genomas virales presentes en las muestras problema mediante preamplificación por RCA seguida de LPCR tipo-específica.

REFERENCIAS

- Arias-Pulido H, Peyton CL, Joste NE, Vargas H, Wheeler CM (2006) Human papillomavirus type 16 integration in cervical carcinoma in situ and in invasive cervical cancer. *Journal of clinical microbiology* 44:1755-1762
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst* 87:796-802
- Cabrerizo M, Bartolome J, Carreno V (2002) In vitro infection of human peripheral blood mononuclear cells by a defective hepatitis B virus with a deletion in the PreS1 region of the viral genome. *J Viral Hepat* 9:265-271
- Cricca M, Morselli-Labate AM, Venturoli S, Ambretti S, Gentilomi GA, Gallinella G, Costa S, Musiani M, Zerbini M (2007) Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions. *Gynecologic oncology* 106:549-557
- Cullen AP, Reid R, Champion M, Lorincz AT (1991) Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 65:606-612
- de la Rosa R (2013) Prevalencia de los tipos de virus del papiloma humano según el grado de las lesiones neoplásicas del cérvix y la edad: estudio transversal en mujeres referidas a colposcopia en el estado de San Luis Potosí, México. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H (2004) Classification of papillomaviruses. *Virology* 324:17-27
- Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS (2001) Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome research* 11:1095-1099
- Durst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L (1985) The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *The Journal of general virology* 66 (Pt 7):1515-1522
- Ehrt S, Schnappinger D (2003) Isolation of plasmids from *E. coli* by alkaline lysis. *Methods Mol Biol* 235:75-78
- Favre M (1975) Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J Virol* 15:1239-1247
- GE-Healthcare-Life-Sciences (2013) Illustra nucleic acid amplification: Illustra TempliPhi 100/500 amplification kits
- Giri L, Feiss MG, Bonning BC, Murhammer DW (2012) Production of baculovirus defective interfering particles during serial passage is delayed by removing transposon target sites in fp25k. *J Gen Virol* 93:389-399
- Hernández-Arteaga LES (2010) La carga de virus del papiloma humano tipo 16 no correlaciona con las lesiones neoplásicas del cérvix y es consistente con delecciones de los genes virales E2 y E6. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosi, Mexico
- Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, Basu J, Tachezy R, Lewis R, Romney S (1995) Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 87:1365-1371
- Howley PM, Ganem D, Kieff E (2011) DNA viruses. In: DeVita Jr. VT, Lawrence TS, Rosenberg SA (eds) *DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles and practice of oncology*. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp 173-185
- Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF (1995) Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *J Virol* 69:2989-2997
- MacLachlan NJ, Dubovi EJ (2011) Virus replication. In: Fenner's veterinary virology. Academic Press, London, pp 41-42

- Magaña-León C (2009) Clonación del genoma de la variante Potosina del Virus del Papiloma Humano tipo 16. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, San Luis Potosí, México
- Meiring TL, Salimo AT, Coetzee B, Maree HJ, Moodley J, Hitzeroth, II, Freeborough MJ, Rybicki EP, Williamson AL (2012) Next-generation sequencing of cervical DNA detects human papillomavirus types not detected by commercial kits. *Viol J* 9:164
- Nagao S, Yoshinouchi M, Miyagi Y, Hongo A, Kodama J, Itoh S, Kudo T (2002) Rapid and sensitive detection of physical status of human papillomavirus type 16 DNA by quantitative real-time PCR. *J Clin Microbiol* 40:863-867
- New-England-BioLabs (2013) pUC19 DNA: Location of Sites: New England BioLabs applications
- Premier-Biosoft (2013) Primer premier. A comprehensive PCR primer design software. Premier Biosoft. Accelerating research in life sciences
- Rector A, Tachezy R, Van Ranst M (2004) A sequence-independent strategy for detection and cloning of circular DNA virus genomes by using multiply primed rolling-circle amplification. *Journal of virology* 78:4993-4998
- Romanczuk H, Thierry F, Howley PM (1990) Mutational analysis of cis elements involved in E2 modulation of human papillomavirus type 16 P97 and type 18 P105 promoters. *J Virol* 64:2849-2859
- Roux L, Simon AE, Holland JJ (1991) Effects of defective interfering viruses on virus replication and pathogenesis in vitro and in vivo. *Adv Virus Res* 40:181-211
- Rowe WP, Baum SG (1964) Evidence for a Possible Genetic Hybrid between Adenovirus Type 7 and Sv40 Viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 52:1340-1347
- Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M, Tommasino M, Gheit T (2010) Abundance of multiple high-risk human papillomavirus (HPV) infections found in cervical cells analyzed by use of an ultrasensitive HPV genotyping assay. *J Clin Microbiol* 48:143-149
- Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S, Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bultmann B (2004) Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42:3176-3184
- Stauffer Thompson KA, Rempala GA, Yin J (2009) Multiple-hit inhibition of infection by defective interfering particles. *J Gen Virol* 90:888-899
- Stevens H, Rector A, Van Ranst M (2010) Multiply primed rolling-circle amplification method for the amplification of circular DNA viruses. *Cold Spring Harb Protoc* 2010:pdb prot5415
- Thompson KA, Yin J (2010) Population dynamics of an RNA virus and its defective interfering particles in passage cultures. *Viol J* 7:257
- Volkow P, Rubi S, Lizano M, Carrillo A, Vilar-Compte D, Garcia-Carranca A, Sotelo R, Garcia B, Sierra-Madero J, Mohar A (2001) High prevalence of oncogenic human papillomavirus in the genital tract of women with human immunodeficiency virus. *Gynecol Oncol* 82:27-31
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N (1999) Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19
- Yount JS, Kraus TA, Horvath CM, Moran TM, Lopez CB (2006) A novel role for viral-defective interfering particles in enhancing dendritic cell maturation. *J Immunol* 177:4503-4513