



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

**DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

**CLONACIÓN DEL GENOMA DE LA VARIANTE  
POTOSINA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO TIPO  
16**

Tesis que presenta

**CLAUDIA MAGAÑA LEÓN**

Para obtener el grado de

**Maestra en Ciencias en Biología Molecular**

**Director de Tesis:**

**Dr. Rubén López-Revilla**



## CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE TESIS

La tesis “**Clonación del genoma de la variante potosina del virus del papiloma humano tipo 16**” presentada para obtener el Grado de de Maestra en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Claudia Magaña León** y aprobada el **13 de Julio de 2009** 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 Riego Ruiz  
Asesora de la tesis

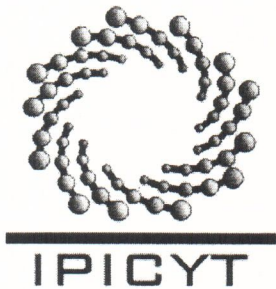
Dr. Sergio Casas Flores  
Asesor de la tesis



## 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. 211459) 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 065 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 3 días del mes de agosto del año 2009, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Lina Raquel Riego Ruiz</b>	<b>Presidenta</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. J. Sergio Casas Flores</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Rubén Hipólito López Revilla</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>

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

**MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Claudia Magaña León**

sobre la Tesis intitulada:

*Clonación del genoma de la Variante Potosina del Virus del Papiloma Humano Tipo 16*

que se desarrolló bajo la dirección de

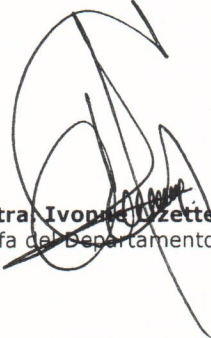
**Dr. Rubén Hipólito López Revilla**

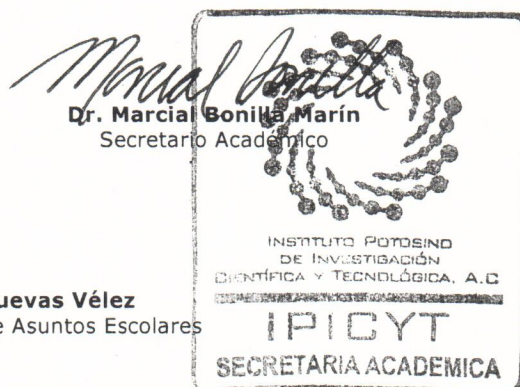
El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 13:50 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 3 días del mes de agosto de 2009.

  
**Mtra. Ivonne Luzette Cuevas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares





## **A MI FAMILIA**

Nunca te conceden un sueño sin concederte también la facultad de convertirlo en realidad; sin embargo, es posible que te cueste trabajo. La gran victoria que hoy parece fácil es el resultado de pequeñas victorias que pasaron desapercibidas.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE CON SU ENSEÑANZA, AYUDA TÉCNICA, CONSEJO Y APOYO INCONDICIONAL, RECORRIERON CONMIGO EL CAMINO HACIENDO POSIBLE LA CULMINACIÓN DE ESTE TRABAJO.**

**¡MUCHAS GRACIAS!**

## RESUMEN

**CONTEXTO.** En México se registran anualmente alrededor de 12,516 casos nuevos y 5,777 defunciones por cáncer cervicouterino. San Luis Potosí es uno de los estados más afectados con una tasa de mortalidad superior a la media nacional. Nuestro grupo demostró que las lesiones preneoplásicas severas y el cáncer cervicouterino invasor predominan entre las mujeres más jóvenes de la ciudad de San Luis Potosí, que en esta ciudad el subtipo Europeo (E) de VPH16 es el de mayor prevalencia y en él predomina la variante A334G (“potosina”), que parece ser más oncogénica que la variante prototípica del subtipo E. El propósito de este trabajo fue desarrollar un protocolo eficiente para clonar el genoma completo de VPH16 que permita secuenciar y registrar la variante potosina de VPH16 y seguir clonando y registrando nuevos subtipos y variantes de VPH que circulan en esta región. **MÉTODOS.** Diseñamos la pareja de oligonucleótidos convergentes Glob8k-F/Glob8k-R para generar un amplicón de 8,079 pares de bases (pb), que abarca los nucleótidos 5, 203, 323 a 5, 211, 7401 de la familia génica de la  $\beta$ -globina humana; efectuamos la amplificación por L-PCR empleando las condiciones de Stewart et al., con polimerasa *rTth*, que produce extremos romos. Utilizamos las parejas de oligonucleótidos PEG07/12 de Stewart et al., y VPH16-F/R diseñada por nosotros y las condiciones empleadas para el amplicón  $\beta$ -globina-8 kb para generar el amplicón VPH16-8 kb con el genoma viral completo. Digerimos con *Bam* HI una mezcla de L-PCR con el amplicón de 8 kb obtenido con la pareja VPH16-F/R. Purificamos el amplicón VPH16-8 kb electroforéticamente y adicionamos un tallo-A a sus extremos con *Taq* DNA polimerasa en presencia de dATP. Ligamos el amplicón modificado al vector de clonación TOPO-XL y con la mezcla de ligación electroporamos células de *Escherichia coli* TOP 10 F'. Analizamos electroforéticamente el DNA plasmídico de 14 transformantes resistentes a kanamicina e identificamos el tipo de VPH del inserto de pCML1620 mediante PCR multiplex anidada (PCR-MA) del oncogén E6 empleando como controles positivos DNA de la línea celular SiHa, transformada por VPH16, y de la línea celular HeLa transformada por VPH18. **RESULTADOS.** Aseguramos la calidad del DNA de los raspados cervicales VPH-16 positivos mediante su capacidad para generar el amplicón  $\beta$ -globina 8 kb por L-PCR con la pareja de oligonucleótidos Glob8k-F/R. Con la pareja VPH16-F/R obtuvimos la banda única de 8 kb esperada para el genoma viral completo amplificado a partir de raspados VPH16 positivos de calidad asegurada. Al incubar el amplicón VPH16-8 kb con *Bam* HI obtuvimos las dos bandas (de 6,150 y 1,754 pb) esperadas para el genoma completo de VPH16. Con las mezclas de ligación del amplicón VPH16-8 kb unido al vector TOPO XL obtuvimos transformantes de *E. coli* TOP 10 F' por electroporación. Trece de 14 clonas transformantes de *E. coli* TOP10 portaron una banda plasmídica única enmascarada por comigrar con el DNA cromosómico. El inserto de la construcción pCML1620 contiene el genoma de VPH16 dado que el amplicón generado por PCR-MA para la tipificación fue del mismo tamaño que el de la línea SiHa. **CONCLUSIONES.** La generación del amplicón  $\beta$ -globina-8 kb con el protocolo de L-PCR empleando polimerasa *rTth* y los oligonucleótidos Glob8k-F/R asegura la calidad de las muestras cervicales VPH16 positivas para amplificar el genoma viral completo. La pareja de oligonucleótidos PEG07/12 es ineficaz, pero la pareja VPH16-F/R diseñada por nosotros sí genera el amplicón de 8 kb con el patrón de restricción esperado para el genoma completo de VPH16. El amplicón VPH16-8 kb purificado electroforéticamente y adicionado con el tallo-A en sus extremos es ligado eficientemente *in vitro* al vector TOPO-XL. La mayoría de las clonas de *E. coli* TOP10 transformadas con las construcciones que portan el amplicón VPH16-8 kb contienen plásmidos que comigran con el DNA cromosómico. El genoma viral completo que constituye el inserto de la construcción pCML1620 corresponde al tipo 16 de VPH. La secuenciación de pCML1620 podría verificar si el inserto corresponde a la variante potosina de VPH16. Este trabajo sienta las bases para seguir clonando nuevos subtipos y variantes de VPH circulantes en esta región.

## ABSTRACT

**BACKGROUND.** In Mexico each year are recorded about 12,516 new cases and 5,777 deaths due to cervical cancer. San Luis Potosi is one of the states most affected, with a mortality rate higher than the national average. Our group demonstrated that severe preneoplastic lesions and invasive cervical cancer are more prevalent in the youngest women of San Luis Potosi city and that the HPV16 European (E) subtype has the highest prevalence and the A334G (“Potosina”) variant, which appears to be more oncogenic than the prototypic E subtype variant, predominates in its oncogene E6 sequences. The purpose of this work was to develop an efficient protocol for cloning the complete HPV16 genome from cervical scrapings that would allow to clone and register the recently discovered HPV16 Potosina variant and to keep cloning and registering new HPV subtypes and variants circulating in this region. **METHODS.** The Glob8k-F/Glob8k-R convergent primer pair was designed to generate a 8,079-base-pair (bp) amplicon, spanning nucleotides 5, 203, 323 to 5, 211, 7401 of the beta globin gene cluster generated under the L-PCR conditions described by Stewart et al., with *rTth* polymerase, which produces blunt ends. To generate the HPV16 8 kb amplicon the HPV16-F/R primer pair and amplification conditions for the  $\beta$ -globin-8 kb amplicon were used. *Bam* HI digestion was performed on a L-PCR mixture containing the 8 kb amplicon generated with the HPV16-F/R pair. A-tailing was added to the ends of electrophoretically purified HPV16-8 kb amplicon with *Taq* DNA polymerase in the presence of dATP. The modified amplicon was then ligated *in vitro* to the TOPO-XL cloning vector and used to transform *Escherichia coli* TOP 10 F’ cells by electroporation. DNA from 14 kanamycin-resistant clones was analyzed by electrophoresis and the HPV type of the pCML1620 insert was identified by nested multiplex PCR (NM-PCR) of the E6 oncogene. **RESULTS.** The quality of HPV16 positive cervical scrapings was assured for their ability to generate the  $\beta$ -globin-8 kb amplicon with the Glob8k-F/R primer pair. With the HPV16-F/R pair the 8 kb band expected for the complete viral genome amplified from HPV16 positive scrapings with assured quality was obtained. Digestion of the HPV16-8 kb amplicon with *Bam* HI generated the two bands (6,150 and 1,754 bp) expected for the complete HPV16 genome. *E. coli* TOP10 transformants were obtained by electroporation with the HPV16-8 kb plus TOPO XL ligation mixtures. Thirteen of 14 *E. coli* TOP10 transformant clones carried a plasmid DNA band masked by its electrophoretic comigration with chromosomal DNA. The insert of the pCML1620 construct contains the HPV16 genome since the amplicon generated by MN-PCR typing has the same size as that of the SiHa cell line. **CONCLUSIONS.** Generation of the  $\beta$ -globin 8 kb amplicon by L-PCR using *rTth* polymerase and Glob8k-F/R primers ensures the quality of HPV16 positive cervical samples to amplify the complete viral genome. The PEG07/12 primer pair is ineffective, but the HPV16-F/R pair designed by us generates the HPV16 8 kb amplicon that has the *Bam* HI restriction pattern (bands of 6,150 and 1,754 bp) expected for the complete HPV16 genome. Electrophoretically purified HPV16 8 kb amplicon to which A-tailing is added is efficiently linked to the XL-TOPO vector. Most *E. coli* TOP 10 F’ clones transformed by constructs with HPV16 8 kb amplicon inserts carry plasmids comigrating with chromosomal DNA. The complete viral genome of the pCML1620 construct corresponds to HPV16. Sequencing pCML1620 could verify if the insert corresponds to the Potosina HPV16 variant. This work lays the foundation for further cloning new HPV subtypes and variants circulating in this region.



## CONTENIDO

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE TESIS.....	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	V
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIAL Y MÉTODOS.....	4
Amplificación de VPH16 con la pareja de oligonucleótidos PEG07/12.....	4
Amplicón $\beta$ -globina humana de 8 kb.....	4
Generación y restricción del amplicón VPH16-8 kb.....	5
Purificación del amplicón VPH-8 kb y adición de tallo-A en sus extremos.....	5
Ligación <i>in vitro</i> y obtención de clonas transformantes.....	6
Detección ultrarrápida de colonias transformantes.....	6
Aislamiento y caracterización de pCML1620.....	7
RESULTADOS.....	8
Amplificabilidad del DNA de los raspados cervicales.....	8
El amplicón $\beta$ -globina-8 kb asegura la calidad de las muestras.....	8
La pareja PEG07/12 no genera el amplicón VPH16-8 kb.....	9
La pareja VPH16-F/R sí genera el amplicón VPH16 ~8 kb.....	9
La banda amplificada con la pareja VPH16-F/R da el patrón de restricción esperado con <i>Bam</i> HI para el genoma completo de VPH16.....	10
Purificación del amplicón VPH16-8 kb.....	10
Obtención de transformantes de <i>E. coli</i> TOP 10 F <sup>'</sup> .....	11
Las clonas comigran con el DNA cromosómico y portan el oncogén E6 de VPH16.....	11
REFERENCIAS.....	18

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados por Stewart et al (1995).....	21
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para generar el amplicón de $\beta$ -globina (8,079 pb).....	22
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para amplificar el genoma completo de VPH16 (7,904 pb).....	23
Tabla 4. Componentes de la mezcla de L-PCR (50 $\mu$ L).....	24
Tabla 5. Programa del termociclador.....	25

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del genoma de VPH16.....	26
Figura 2. Estrategia para clonar el amplicón VPH16-8K de raspados cervicales.....	27
Figura 3. Gradiente de temperatura de alineamiento para amplificar el producto $\beta$ -globina-8 kb.....	28
Figura 4. L-PCR de raspados VPH16-positivos con la pareja Glob8k.....	29
Figura 5. L-PCR de raspados VPH16-positivos con las parejas PEG07/12 y Glob8k.....	30
Figura 6. L-PCR de raspados VPH16-positivos con la pareja VPH16-F/R.....	31
Figura 7. Restricción del amplicón VPH16 con <i>Bam</i> HI.....	32
Figura 8. Purificación en gel del amplicón de 8kb.....	33
Figura 9. Detección ultrarrápida de colonias transformantes.....	34
Figura 10. Plásmido pCML1620 purificado.....	35
Figura 11. Tipificación de CML1620 mediante PCR multiplex anidada.....	36

## INTRODUCCIÓN

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda causa de muerte por cáncer entre las mujeres del mundo y en México (Parkin et al., 2005). El principal factor de riesgo para el desarrollo del CaCu es la infección persistente por virus del papiloma humano (VPH), ya que el 99.7% de los casos de CaCu invasor son VPH-positivos (Walboomers et al., 1999; zur Hausen, 1997), por lo que dicha infección se ha establecido como una causa necesaria para el desarrollo de la enfermedad (Castellsague et al., 2006; Brink et al., 2007).

Entre los factores de riesgo para el desarrollo del CaCu destacan el número de parejas sexuales, el inicio precoz de la actividad sexual (Kuzman et al., 2007), la multiparidad (Castellsague et al., 2002), la inmunosupresión, el tabaquismo, el uso de anticonceptivos orales y la coinfección con agentes de transmisión sexual tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus del herpes simple tipo 2 (Castellsague et al., 2003; Smith et al., 2002).

Los VPH pertenecen a la familia *Papillomaviridae*, y su genoma es DNA de doble cadena de ~8000 pares de bases (pb). Los viriones miden 52 a 54 nm de diámetro, carecen de envoltura lipídica y su cápside icosaédrica está formada por 72 capsómeros. El genoma puede dividirse en tres zonas: la región larga de control (LCR), la región temprana (E, por 'early' en inglés) y la región tardía (L, por 'late' en inglés) (Fig. 1).

La LCR, localizada entre los genes L1 y E6, abarca el 15% del genoma viral y contiene los promotores que inician la replicación y controlan la transcripción (Münger et al., 2004; de Villiers et al., 2004). La región temprana representa el 45% del genoma y comprende los genes virales responsables de la transformación neoplásica (oncogenes E6 y E7) y de la integración del genoma viral al de la célula huésped (E2 y E1). La región tardía comprende el 40% del genoma y contiene los dos genes que codifican las proteínas estructurales de la cápside (L1 y L2).

Han sido identificados más de 100 genotipos de VPH (Münger et al., 2004; de Villiers et al., 2004; Chan et al., 1995) que se clasifican como de alto y bajo riesgo por su asociación o no al CaCu invasor. Los 15 de alto riesgo más prevalentes son, en orden decreciente, los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, asociados al 95% de los CaCu invasores. Entre los de bajo riesgo los 10 más prevalentes son los tipos

11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72 y 81, de los cuales el 6 y 11 causan el 90% de los condilomas genitales (Muñoz et al., 2003; Bosch et al., 1995).

El marco de lectura abierto (ORF) del gen L1 es la región más conservada del genoma, por lo cual se ha utilizado para la identificación de nuevos tipos, subtipos y variantes de VPH, aunque la secuencia del gen E6 también puede ser empleada para este propósito (Yamada, 1997). Para que un nuevo tipo de VPH sea reconocido, su genoma completo debe ser clonado y la secuencia del ORF del gen L1 debe diferir en más del 10% de la de los tipos conocidos. Diferencias de identidad entre el 2% y el 10% definen a los subtipos y menores del 2% a las variantes (de Villiers, 2004). Algunas variantes han sido asociadas a lesiones más avanzadas o tipos histológicos más agresivos (Xi 1997; Zehbe 1998; López Revilla et al., 2009).

En México anualmente se registran alrededor de 12,516 casos nuevos y 5,777 defunciones por CaCu (GLOBOCAN, 2002) siendo San Luis Potosí uno de los estados más afectados, con una tasa de mortalidad superior a la media nacional (INEGI/SSA, 2006). El 70% de los casos de CaCu invasor en mujeres mexicanas de 35 años o menos ha sido asociado al subtipo Asiático Americano (AA) de VPH16 (Casas et al., 1999; del Refugio Gonzales-Losa et al., 2004; Ordonez et al., 2004), 21 veces más frecuente que el subtipo Europeo (E) en los casos de CaCu invasor de mujeres jóvenes (Berumen et al., 2001).

Nuestro grupo demostró que las lesiones preneoplásicas severas y el cáncer cervicouterino invasor predominan entre las mujeres más jóvenes de la ciudad de San Luis Potosí (R. López-Revilla y L. Rosales-Ortuño, datos no publicados) y que en la ciudad de San Luis Potosí el subtipo E de VPH16 es el de mayor prevalencia (López-Revilla et al., 2008). Por otra parte, en las secuencias del oncogén E6 del subtipo E de VPH16 que infectan a mujeres residentes en la ciudad de San Luis Potosí predomina la variante A334G, que parece ser más oncogénica que la variante prototípica del subtipo E (López-Revilla et al., 2009).

El propósito de este trabajo fue desarrollar un protocolo eficiente para la clonación del genoma completo de VPH16 presente en raspados cervicales que nos permita primero clonar y registrar la variante potosina de VPH16 recién descubierta y luego seguir clonando y registrando los tipos, subtipos y variantes de VPH adicionales más frecuentes que circulan en esta región.

Para alcanzar este objetivo decidimos emplear el método de amplificación por polimerización en cadena de largo alcance (L-PCR) descrito por Stewart et al., (1995). La estrategia empleada se resume en la Figura 2. Primero decidimos generar un amplicón de 8 kb que incluyera al gen de  $\beta$ -globina humana para asegurar la calidad del DNA celular presente en las muestras de raspados cervicales VPH16-positivos. Una vez asegurada así la calidad de las muestras, diseñamos la pareja de oligonucleótidos divergentes VPH16-F/R y mediante L-PCR amplificamos el genoma completo de VPH16, el cual ligamos al vector TOPO-XL para obtener 150 clonas transformantes de *Escherichia coli* TOP10 por electroporación, 13 de las cuales contenían plásmidos que comigran con el DNA cromosómico. Probamos la clona CML1620 por PCR multiplex anidada del oncogén E6 con el método de Sotlar et al. (2004), que permite identificar 19 tipos de VPH de alto y de bajo riesgo. La detección fue positiva y la tipificación correspondió a VPH16, ya que el amplicón obtenido fue del mismo tamaño que el de la línea celular SiHa, transformada por VPH16, empleada como control positivo. Estos resultados nos permiten afirmar que la construcción pCML1620 contiene el genoma completo de VPH16 insertado en el vector TOPO-XL; estamos en proceso de enviar el plásmido para secuenciar la clona y saber si efectivamente corresponde a la variante potosina de VPH16.

Con este trabajo también hemos demostrado que únicamente las muestras capaces de generar el amplicón  $\beta$ -globina-8 kb contienen DNA de calidad suficiente para amplificar el genoma completo de VPH16 por L-PCR con el método de Stewart et al. (1995). Por otra parte, la pareja de oligonucleótidos divergentes para amplificar el genoma completo VPH16 empleada por los autores mencionados fue ineficaz en nuestras manos, mientras que la pareja VPH16-F/R que nosotros diseñamos sí permitió amplificar el genoma completo de VPH16 a partir de raspados cervicales de calidad asegurada. Confirmamos además que la repurificación de la banda principal del gel correspondiente al amplicón completo de VPH16 es un método idóneo para asegurar la ligación del amplicón de interés al vector de clonación y que el empleo de TOPO-XL permite la selección adecuada de las colonias transformantes. Un hallazgo interesante que en su momento representó además un obstáculo fue el enmascaramiento de las clonas candidato que al ser sometidas a electroforesis en agarosa comigraron en la zona del DNA cromosómico de *E. coli* por el tamaño relativamente grande del inserto.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **Amplificación de VPH16 con la pareja de oligonucleótidos PEG07/12**

Utilizamos DNA de raspados cervicales con infección única por VPH16 previamente detectada y tipificada en nuestro laboratorio. Empleando la pareja de oligonucleótidos PEG07/12 (Tabla1), llevamos a cabo la amplificación mediante la reacción de polimerización en cadena de largo alcance (L-PCR) de Stewart et al. (1995) con reactivos de Applied Biosystems. Analizamos las mezclas del PCR con productos de amplificación mediante electroforesis en geles de TAE-agarosa al 1% corridos a 85 V por 1 h; los teñimos 20 min con bromuro de etidio (1 mg/mL) y registramos las imágenes mediante transiluminación UV en un fotodocumentador ChemiDoc EQ (BioRad, Hercules, CA).

### **Amplificación $\beta$ -globina humana de 8 kb**

Obtuvimos DNA de sangre humana con el kit de extracción de MoBio. Con el programa Primer Premier 5.0 (Premier Biosoft Internacional) diseñamos la pareja de oligonucleótidos Glob8k-F/R (Tabla 2) y realizamos la amplificación en un termociclador Techne (modelo Touchgene Gradient) con mezclas de 50  $\mu$ L que contenían:  $Mg(OAc)_2$  1.25 mM, dNTP's 0.2 mM c/u, mezcla de oligonucleótidos 0.4  $\mu$ M c/u, 1 U de DNA polimerasa *rTth* (Applied Biosystems) y 2  $\mu$ L de DNA molde (Tabla 3). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes (Tabla 5): desnaturalización inicial a 94° C por 15 seg, seguida de 40 ciclos de amplificación con desnaturalización a 94° C por 15 seg, alineamiento a 56.6°C por 1 min, extensión a 68°C por 10 min; extensión final a 72°C por 10 min.

Para asegurar la calidad de los raspados cervicales VPH16-positivos empleamos las condiciones descritas anteriormente, utilizando como molde DNA de raspados cervicales con infección única por VPH16, previamente tipificadas en nuestro laboratorio.

Observamos los productos de L-PCR mediante electroforesis en geles de TAE-agarosa al 1% corridos a 85 V por 1 h, seguida de tinción con bromuro de etidio (1 mg/mL) y transiluminación UV en el fotodocumentador ChemiDoc EQ. Los tamaños de las bandas principales fueron determinados con el programa Quantity One (BioRad, Hercules, CA).

### **Generación y restricción del amplicón VPH16-8 kb**

Utilizamos la pareja de oligonucleótidos VPH16-F/R diseñada con el programa Primer Premier 5.0 (Tabla 3) y las mismas condiciones de amplificación y ciclos de incubación para el amplicón  $\beta$ -globina-8 kb, con una temperatura de alineamiento de 59.6°C (Tablas 4 y 5).

Realizamos la digestión enzimática de 5  $\mu$ L de una mezcla de L-PCR que contenía el amplicón de 8 kb obtenido con la pareja VPH16-F/R mediante incubación con 15 U de *Bam* HI (Invitrogen) por 2 h en un termoblock a 37°C. Luego hicimos el análisis electroforético de 10  $\mu$ L de la mezcla de digestión en geles de TAE-agarosa al 1% que corrimos a 85 V por 1 h. Posteriormente teñimos por 20 min con bromuro de etidio (1 mg/mL) y visualizamos los geles en el fotodocumentador ChemiDoc EQ. Determinamos el tamaño de las bandas de DNA con el programa Quantity One.

### **Purificación del amplicón VPH-8 kb y adición de tallo-A en sus extremos**

En un gel de TAE-agarosa al 1% cargamos 10 y 30  $\mu$ L del producto de L-PCR en pozos vecinos y lo corrimos a 85 V por 1 h. Al término de la corrida cortamos 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  $\mu$ L y 30  $\mu$ L de muestra. Teñimos con bromuro de etidio (1 mg/mL) por 20 min únicamente el carril con 10  $\mu$ L y al visualizar en el fotodocumentador medimos la migración de la banda de interés con una regla. Luego tomamos la misma medida en la otra parte, cortamos la región con la banda del tamaño esperado sin exponer a la luz UV y purificamos el DNA con el kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para añadir el tallo-A (desoxiadenosina) a los extremos del amplicón de  $\sim$  8 kb correspondiente al genoma completo de VPH y ligarlo al vector, a 20  $\mu$ L de producto de L-PCR purificado agregamos los siguientes componentes en un volumen total de 40  $\mu$ L, a las concentraciones finales indicadas: dATP 0.2 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, amortiguador *Taq* Pol 10 $\times$  y 20 Unidades de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen), e incubamos la mezcla en un termoblock a 70°C por 1 h.

### **Ligación *in vitro* y obtención de clonas transformantes**

Para preparar la mezcla de ligación empleamos 1  $\mu\text{L}$  del vector TOPO-XL (10 ng/  $\mu\text{L}$ ) y 4  $\mu\text{L}$  del amplicón VPH16-8 kb purificado. Incubamos 5 min a temperatura ambiente y al cabo de este tiempo añadimos 1  $\mu\text{L}$  de solución stop 6 $\times$  (NaCl 0.3 M,  $\text{MgCl}_2$  0.06 M), mezclamos e incubamos a temperatura ambiente por 30 seg.

A 50  $\mu\text{L}$  de células de *E. coli* TOP 10 F' electrocompetentes agregamos 2  $\mu\text{L}$  de mezcla de ligación y mezclamos suavemente evitando la formación de burbujas. Transferimos la mezcla a una celda de electroporación de 0.2 cm que incubamos en hielo por 2 min. Luego electroporamos con un pulso de 2.5 KV, 400  $\Omega$  y 25  $\mu\text{F}$ , transferimos la mezcla electroporada a un tubo Eppendorf de 1.5 mL con 1 mL de caldo LB y la incubamos por 2 h en el cuarto estufa a 37°C con agitación a 200 rpm. Transcurrido este tiempo de recuperación centrifugamos la mezcla a 13000 rpm por 2 min, descartamos el sobrenadante y resuspendimos la pastilla en 200  $\mu\text{L}$  de caldo LB fresco. Inoculamos 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla en placas de agar LB-kanamicina (30 mg/mL) que incubamos toda la noche a 37°C.

### **Detección ultrarrápida de colonias transformantes**

Sometimos un lote de 14 colonias transformantes kanamicina<sup>R</sup> a detección ultrarrápida. Por cada colonia rotulamos un tubo Eppendorf de 1.5 mL al que agregamos 30  $\mu\text{L}$  de buffer de carga para electroforesis 4 $\times$  (glicerol al 30%, azul de bromofenol, xilencianol y Orange G) y 3  $\mu\text{L}$  de SDS al 1%. Tomamos cada colonia transformante seleccionada con una punta de micropipeta nueva y la añadimos al tubo correspondiente mezclando cuidadosamente por pipeteo. Agitamos la mezcla con el vórtex por 5 seg, agregamos 33  $\mu\text{L}$  de fenol cloroformo 1:1, mezclamos bien con el vórtex, centrifugamos a 13000 rpm por 2 min y cargamos 10  $\mu\text{L}$  de la fase superior (acuosa) en un gel TAE-agarosa al 1% que corrimos a 85 V por 1 h. Al término de la corrida teñimos por 20 min con bromuro de etidio (1mg/mL) y visualizamos por transiluminación UV en el fotodocumentador.

### **Aislamiento y caracterización de pCML1620**

Inoculamos una asada de la clona transformante CML1620 en 3 mL de caldo LB con kanamicina (30 mg/mL) e incubamos con agitación toda la noche a 37°C. Añadimos este preinóculo a un matraz erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo LB-kanamicina y reincubamos con agitación a 37°C toda la noche. Purificamos el DNA plasmídico con el kit Pure Yield, MidiPep System (Promega, Madison, WI) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Identificamos el tipo de VPH del inserto de la construcción pCML1620 con el método de PCR multiplex anidada del oncogén E6 de Sotlar et al. (2004) utilizado rutinariamente en nuestro laboratorio.



## RESULTADOS

### **Amplificabilidad del DNA de los raspados cervicales**

Para asegurar la amplificabilidad del DNA de las muestras cervicales VPH16-positivas, a partir de las cuales pretendíamos clonar el genoma completo de la variante potosina de VPH16 con el sistema de la polimerasa de largo alcance (L-PCR) descrito por Stewart et al. (1995), demandamos que cada muestra debería generar un amplicón de ~ 8,000 pb de la familia génica de las  $\beta$ -globinas, amplificando el gen de  $\beta$ -globina humana, de copia única en el genoma humano haploide.

La pareja de oligonucleótidos convergentes Glob8b-F/Glob8k-R fue diseñada para generar un amplicón de 8,079 pb, que abarca los nucleótidos 5, 203, 323 a 5, 211, 401 de la familia génica de la  $\beta$ -globina humana. Realizamos la amplificación por L-PCR empleando como molde DNA de sangre humana en las condiciones descritas por Stewart et al. (1995). Obtuvimos la banda esperada de ~8 kb y varios productos inespecíficos adicionales, los cuales dejaron de generarse después de realizar un experimento con un gradiente de temperatura de alineamiento (Fig. 3), en el cual encontramos que a 56.6°C solamente se genera la banda de 8 kb.

Concluimos que el diseño de los oligonucleótidos y el protocolo empleado son adecuados para generar el amplicón de 8 kb y que el sistema es suficientemente sensible para detectar las dos copias del gen de  $\beta$ -globina presentes por célula. Decidimos de aquí en adelante emplear el protocolo de Stewart et al. (1995) para amplificar el genoma completo de VPH16 en muestras positivas de amplificabilidad asegurada empleando controles positivos con DNA de VPH16 y controles negativos sin DNA, con temperatura de alineamiento a 56.6°C en presencia de la pareja de oligonucleótidos Glob8k-F/R.

### **El amplicón $\beta$ -globina-8 kb asegura la calidad de las muestras**

Para asegurar que las muestras portadoras de la “variante potosina” en las cuales pretendíamos amplificar el genoma completo de VPH16 eran de calidad suficiente para este fin, probamos su capacidad para generar el amplicón  $\beta$ -globina-8 kb por L-PCR empleando la pareja de oligonucleótidos convergentes Glob8K-F/R ya descritos.

En el análisis electroforético observamos que de seis muestras VPH16-positivas, solamente cuatro generaron el amplicón  $\beta$ -globina 8 kb esperado (Fig. 4).

Así confirmamos que no todas las muestras permiten obtener amplicones de 8 kb y decidimos que en lo sucesivo únicamente las capaces de generar el amplicón  $\beta$ -globina-8 kb podrían tener DNA de calidad suficiente para amplificar el genoma completo de VPH16 mediante L-PCR con la pareja de oligonucleótidos PEG07/12 de Stewart et al. (1995).

### **La pareja PEG07/12 no genera el amplicón VPH16-8 kb**

Para amplificar el genoma completo de VPH16 a partir de muestras positivas de calidad asegurada utilizamos la pareja de oligonucleótidos PGE07/12 y el protocolo de L-PCR de Stewart et al. (1995), con la temperatura de alineamiento empleada por ellos (50.4°C). Controlamos la corrida con la pareja Glob8k-F/R, sabiendo que a la misma temperatura obtendríamos el amplicón esperado  $\beta$ -globina-8 kb con algunas bandas inespecíficas adicionales. En estas condiciones observamos la generación del amplicón  $\beta$ -globina-8 kb y algunas bandas adicionales de menor tamaño en todas las muestras. Con la pareja PEG07/12 obtuvimos un patrón con bandas entre 1 y 6 kb pero ninguna muestra generó el amplicón esperado de 8 kb correspondiente al genoma completo de VPH16 (Fig. 5).

Como el protocolo sí permitió generar el amplicón  $\beta$ -globina pero no el de VPH16 completo esperado con la pareja PEG07/12, concluimos que en nuestras manos las condiciones de amplificación por L-PCR sí son las adecuadas, pero que la pareja de oligonucleótidos para VPH16 es ineficaz. Por ello decidimos diseñar parejas adicionales de oligonucleótidos divergentes para amplificar el genoma completo de VPH16.

### **La pareja VPH16-F/R sí genera el amplicón VPH16 ~8 kb**

Para obtener el amplicón de ~8 kb correspondiente al genoma completo de VPH16 diseñamos la pareja de oligonucleótidos divergentes VPH16-F/R, ubicada en la región larga de control (LCR) con las secuencia de nucleótidos sentido 1-36 y antisentido 7864-7904, respectivamente. Con el mismo protocolo de L-PCR efectuamos la amplificación y obtuvimos la banda única de ~8 kb esperada para el genoma de VPH16 completo (Fig. 6).

Por lo tanto, la pareja de oligonucleótidos VPH16-F/R diseñada por nosotros sí permite amplificar el genoma completo de VPH16 a partir de muestras de cérvix VPH16 positivas de calidad asegurada.

### **La banda amplificada con la pareja VPH16-F/R da el patrón de restricción esperado con *Bam* HI para el genoma completo de VPH16**

Para saber si los productos amplificados con la pareja VPH16-F/R corresponden al genoma de VPH16, efectuamos un análisis de restricción con la enzima *Bam* HI, endonucleasa que debe hacer un corte único en la región L1 del genoma de VPH16 para generar un fragmento de 6,150 pb y otro de 1,745 pb sobre el amplicón que contiene el genoma viral completo de forma lineal.

La digestión de la mezcla de L-PCR dio las dos bandas con los tamaños esperados (Fig. 7); esto indica que el producto amplificado efectivamente corresponde al genoma completo de VPH16, por lo que decidimos purificar para clonarlo.

### **Purificación del amplicón VPH16-8 kb**

Aunque después de la amplificación únicamente observamos la banda principal de VPH16-8 kb, también se generan productos secundarios pequeños que podrían ser más numerosos y por lo tanto disminuir la eficiencia de clonación de los fragmentos deseados por competir con ellos para ligarse al vector. Para asegurar la clonación del fragmento de interés enriquecido, purificamos el producto principal de L-PCR cortando la banda directamente del gel.

Mediante electroforesis del DNA extraído del gel volvimos a observar la misma banda nítida, lo cual indica que este método permite obtener el producto deseado y enriquecido, con un rendimiento suficiente para la clonación (Fig 8). A una mezcla con la banda principal enriquecida decidimos añadir un tallo-A al amplicón en ambos extremos con *Taq* DNA polimerasa en presencia de dATP para facilitar su ligación al vector de clonación.

### **Obtención de transformantes de *E. coli* TOP 10 F'**

Para obtener construcciones con el genoma completo de VPH16 ligamos *in vitro* al vector TOPO-XL el producto de L-PCR VPH16-8 kb purificado y preincubado con *Taq* DNA polimerasa y con estas mezclas de ligación transformamos células *E. coli* TOP 10 F' por electroporación. Así obtuvimos 150 clonas transformantes kanamicina<sup>R</sup> después de dos pases sucesivos en agar LB con kanamicina.

Para determinar si las clonas portan el inserto deseado hicimos una detección ultrarrápida de 14 colonias transformantes. En 13 clonas aparentemente sólo observamos DNA cromosómico pero no las bandas correspondientes al vector con inserto (~11.5 kb) en tanto que la colonia restante contenía una banda que pareció corresponder al vector con un inserto pequeño (Fig. 9).

La doble selección del vector TOPO-XL (dado que contiene el casete de resistencia a kanamicina e interrumpe el gen letal *ccdB* al ligarse el inserto) permite crecer en el medio selectivo únicamente las clonas transformantes que contienen vectores con inserto.

Por lo anterior supusimos que las 13 clonas en las cuales aparentemente había sólo DNA cromosómico podrían en realidad contener vectores con el inserto deseado, que podrían estar enmascarados por comigrar con el DNA cromosómico.

### **Las clonas comigran con el DNA cromosómico y portan el oncogén E6 de VPH16**

Para determinar si las construcciones de las clonas transformantes efectivamente comigran con el DNA cromosómico, purificamos los plásmidos y en el análisis electroforético de los mismos observamos que las clonas transformante efectivamente constan de una banda plasmídica única que comigra con el DNA cromosómico (Fig. 10).

Para verificar si las construcciones purificadas contienen el genoma de VPH16, amplificamos la clona CML1620 con el método de PCR multiplex anidada de Sotlar et al. (2004), que identifica 19 tipos de VPH (13 de alto riesgo y 6 de bajo riesgo). La detección fue positiva y la tipificación determinó que la clona contiene el genoma de VPH16, ya que el amplicón obtenido fue del mismo tamaño que el de la línea celular SiHa transformada por VPH16, pero no que el de la línea celular HeLa transformada por VPH18 (Fig. 11).

Estos resultados permiten afirmar que la estrategia empleada es eficaz, ya que la construcción pCML1620 parece contener el genoma completo de VPH16 ligado al vector TOPO-XL. Estamos en proceso de enviar este plásmido para secuenciar el inserto y saber si efectivamente corresponde a la variante potosina de VPH16.

## DISCUSIÓN

Con la generación del amplicón  $\beta$ -globina-8 kb se asegura la calidad de los raspados cervicales VPH16-positivos para garantizar que el DNA celular de las muestras no está degradado y permite generar un amplicón de tamaño similar al del genoma completo de VPH16. Aunque este procedimiento determina la amplificabilidad y de manera indirecta la integridad del DNA celular para seleccionar los raspados cervicales en los que valdría la pena intentar la amplificación del genoma completo de VPH16, no informa sobre la “carga viral” (i.e., el número de moléculas de genoma viral presentes en las formas replicativas y plasmídicas, libres o encapsidadas), que de ser muy baja podría resultar insuficiente para amplificar y clonar el genoma completo de VPH16.

Aunque el protocolo de amplificación de Stewart et al. (1995) permitió obtener un amplicón  $\beta$ -globina humana de 8 kb de cuyo gen hay dos copias por célula diploide, la pareja de oligonucleótidos divergentes empleada por ellos para amplificar el genoma completo de VPH16 resultó ineficaz en nuestras manos, ya que no nos permitió obtener el amplicón esperado. Sin embargo, la pareja de oligonucleótidos divergentes VPH16-F/R diseñada por nosotros sí nos permitió generar el amplicón de ~8 kb correspondiente al genoma completo de VPH16.

El sitio único de corte para la endonucleasa *Bam* HI en la región L1 del genoma de VPH16 generaría un fragmento de 6,150 pb y otro de 1,754 pb sobre el genoma lineal amplificado con la pareja VPH16-F/R que empleamos nosotros. Nuestro amplicón viral dio exactamente el patrón de restricción esperado con *Bam* HI, con lo cual tuvimos un indicio firme de haber logrado la amplificación específica del genoma completo de VPH16 en los raspados cervicales amplificables.

La clonación de secuencias blanco de gran tamaño, como la realizada en este trabajo, no es tan fácil y directa como la de secuencias blanco menores de 1 kb y requiere además minimizar las manipulaciones para preservar la integridad de las secuencias de interés y prevenir otros factores que interfieren con el proceso.

Por otra parte, las reacciones de amplificación generan productos secundarios pequeños que pueden ser tanto o más numerosos que el deseado y disminuir la eficiencia de clonación del mismo. Para aumentar la eficiencia de clonación del amplicón viral de interés

decidimos purificar el producto de L-PCR previamente separado por electroforesis mediante la escisión de la zona del gel que contenía la banda principal. Este procedimiento efectivamente permitió aislar el producto deseado con rendimiento suficiente para la clonación.

El vector TOPO-XL permite la clonación en un solo paso con alta eficiencia a partir de una reacción de ligación de 5 min, lo cual disminuye el tiempo requerido con otros vectores. Este vector cuenta además con un sistema de doble selección pues contiene el casete de resistencia a kanamicina y provoca la interrupción del gen letal *ccdB* al ligar cada inserto, de tal manera que únicamente construcciones con inserto permiten crecer a las bacterias transformantes resistentes a kanamicina. TOPO-XL además está diseñado para clonar productos de gran tamaño generados por L-PCR, con la ventaja de no requerir ligasa u oligonucleótidos especiales debido a que explota la actividad de la topoisomerasa I del virus de vaccinia que se une al DNA en sitios específicos y corta el esqueleto fosfodiéster después de la secuencia 5'-CCCTT de una cadena (Shuman, 1991). La energía derivada de la hidrólisis del esqueleto fosfodiéster es conservada mediante la formación de un enlace covalente entre el fosfato-3' de la cadena cortada y el residuo tirosil (Tyr-274) de la topoisomerasa I; este enlace fosfotirosil entre el DNA y la enzima puede ser atacado después por el extremo 5'-OH de la cadena original cortada, revirtiendo la reacción y liberando a la topoisomerasa para ligar al inserto (Shuman, 1994).

Aunque TOPO-XL está diseñado para ligar productos generados con enzimas que adicionan un tallo-A y la enzima que nosotros empleamos (*rTth*) genera extremos romos, resolvimos este problema mediante la adición del tallo-A al producto de L-PCR mediante su incubación con *Taq* DNA polimerasa en presencia de dATP. Por lo anterior, consideramos que TOPO-XL es adecuado para la clonación del genoma completo de VPH16.

Empleamos la detección ultrarrápida de colonias transformantes rutinariamente en nuestro laboratorio por ser un método de escrutinio menos laborioso, más rápido y más barato que las minipreps para determinar la presencia y tamaño de los plásmidos en las colonias transformantes.

Una dificultad inesperada que encontramos en este trabajo fue que solamente en una de las 14 clonas transformantes candidato analizadas por detección ultrarrápida observamos

la banda de DNA plasmídico esperada (i.e., de menor tamaño que el DNA cromosómico). Supusimos que estos resultados se explicarían si lo que en realidad ocurrió fue que la única clona con la banda plasmídica visible porta un vector con un inserto más pequeño que el deseado y que las clonas restantes portan los vectores deseados con el genoma de VPH16 completo y tienen un tamaño tal que son enmascarados por el DNA cromosómico debido a que comigran electroforéticamente con él. Esta idea fue confirmada cuando demostramos que el plásmido purificado tiene una migración electroforética similar a la del DNA cromosómico.

El método de PCR multiplex anidada de Sotlar et al. (2004) permite identificar 19 tipos de VPH (13 de alto riesgo y 6 de bajo riesgo). Mediante la primera reacción de PCR directa de la región E6/E7 con tres oligonucleótidos consenso genera un amplicón de ~630 pb en muestras VPH positivas; posteriormente, por PCR multiplex anidada en cuatro mezclas con oligonucleótidos distintos que generan amplicones de tamaño específico para cada uno de los genotipos VPH-AR/-BR identificables, permite determinar el o los tipos virales presentes. Utilizamos este método para verificar el tipo de VPH en la construcción pCML1620 aislada de la clona CML1620 y así confirmamos que dicha construcción contiene el genoma de VPH16 posiblemente completo ya que el amplicón obtenido por PCR multiplex anidada fue del mismo tamaño que el de la línea celular SiHa transformada por VPH16 y diferente del de la línea celular HeLa transformada por VPH18.

Hay cerca de 100 genotipos de VPH identificados (Münger et al., 2004; de Villiers et al., 2004; Chan et al., 1995), que difieren en más del 10% en la secuencia completa de sus genomas (de Villiers et al., 1994). Las mutaciones del genoma de VPH generan subtipos cuando difieren del 2-10% en la secuencia de sus genomas, o variantes cuando la diferencia es  $\leq 2\%$  (Xi et al., 1997; Stewart et al., 1996; Chan et al., 1992; Ho et al., 1991).

Los subtipos virales han sido identificados principalmente con las secuencias de los genes E6, L1 y la región larga de control. En el caso de VPH16, el gen E6 es uno de los más importantes por ser un solo fragmento corto y continuo que posee información suficiente para identificar todos los subtipos y variantes descritos (Kämmer et al., 2000; Eriksson et al., 1999; Veress et al., 1999; Wheeler et al., 1997; Yamada et al., 1995).

El subtipo Europeo (E) es usado como el prototipo de referencia de VPH16 por la mayoría de los autores (Yamada et al., 1995, 1997). Los subtipos de VPH16 difieren en



prevalencia, propiedades químicas y biológicas (i.e., el subtipo AA se replica más eficientemente y estimula más la expresión de los oncogenes E6 y E7), y su implicación en la etiología del cáncer cervicouterino es incierta (Cruz et al., 2004; del Refugio González-Losa et al., 2004; Zehbe et al., 1998; Stöppler et al., 1996).

Esperamos que el análisis de secuencias E6 y L1 y su comparación con las secuencias de referencia nos permitirá determinar si la construcción pCML1620 porta la variante potosina recientemente descrita por nuestro grupo, la cual aparentemente es más oncogénica que el subtipo E prototípico (López-Revilla et al., 2009).

## CONCLUSIONES

1. La generación del amplicón  $\beta$ -globina-8 kb con el protocolo de L-PCR de Stewart et al. (1995) en presencia de polimerasa *rTth* (que produce extremos romos) y los oligonucleótidos Glob8k-F/R diseñados por nosotros, asegura la amplificabilidad de las muestras cervicales VPH16 positivas para seleccionarlas y amplificar el genoma viral completo.
2. La pareja de oligonucleótidos PEG07/12 de Stewart et al. (1995) es ineficaz debido a las características de su secuencia, pero la pareja VPH16-F/R diseñada por nosotros sí genera el amplicón VPH16-8 kb con el patrón de restricción esperado con *Bam* HI (dos bandas, en 6,150 y 1,754 pb) para el genoma completo de VPH16.
3. El amplicón VPH16-8 kb purificado electroforéticamente y adicionado en sus extremos 5' y 3' con tallo-A mediante incubación con dATP en presencia de *Taq* DNA polimerasa es ligado *in vitro* al vector TOPO-XL.
4. Trece de 14 clonas de *E. coli* TOP10 transformadas con el amplicón VPH16-8 kb ligado a TOPO-XL portan una banda plasmídica única que comigra con el DNA cromosómico.
5. Una construcción purificada (pCML1620) sirve de molde para amplificar el producto esperado del oncogén E6 de VPH16.
6. La secuenciación de los genes E6 y L1 de pCML1620 (en proceso) podría verificar si el inserto corresponde a la variante potosina de VPH16.
7. Este trabajo sienta las bases para seguir clonando y registrando nuevos subtipos y variantes de VPH circulantes en esta región.

## REFERENCIAS

- Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J, Galvan SC, Estrada RA, Yunes E, Garcia-Carranca A, Gonzalez-Lira G, Madrigal-de la Campa A: Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 2001, 93(17):1325-1330.
- Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KY: Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) study group. *J Natl Cancer Inst* 1995, 87, 796-802.
- Brink AA, Snijders PJ, Meijer CJ: HPV detection methods. *Dis Markers* 2007, 23(4): 273-81.
- Casas L, Galvan SC, Ordonez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J: Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 1999, 83, 449-455.
- Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N: Environmental co-factors in HPV carcinogenesis. *Virus Res* 2002, 89 (2):191-9.
- Castellsagué X, Diaz M, de SS, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, et al: Worldwide human papillomavirus etiology of cervical adenocarcinoma and its cofactors: implications for screening and prevention. *J Natl Cancer Inst* 2006, 98(5):303-15.
- Castellsagué X, Munoz N. Chapter 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis--role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003, (31):20-8.
- Chan SY, Delius H, Halpern AL, Bernard HU: Analysis of genomic sequences of 95 papillomavirus types: uniting typing, phylogeny, and taxonomy. *J Virol* 1995, 69(5):3074-3083.
- Chan SY, Ho L, Ong CK, Chow V, Drescher B, Dürst M, ter Meulen J, Villa L, Luande J, Mgaya HN, Bernard HU. Molecular variants of human papillomavirus type 16 from four continents suggest ancient pandemic spread of the virus and its coevolution with humankind. *J Virol* 1992, 66: 2057-2066.
- Cortés Gutiérrez EI y Leal Garza CH: Papilomavirus Humano. *Biología Molecular y Patogénesis. Revista Salud Pública y Nutrición* 2001, 2.
- Cruz MR, Cerqueira DM, Cruz WB, Camara GN, Brigido MM, Silva EO, Carvalho LG, Martins CR: Prevalence of human papillomavirus type 16 variants in the Federal District, Central Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2004, 99(3):281-282.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004, 324(1):17-27.
- del Refugio Gonzalez-Losa M, Laviada Mier y Teran MA, Puerto-Solis M, Garcia-Carranca A: Molecular variants of HPV type 16 E6 among Mexican women with LSIL and invasive cancer. *J Clin Virol* 2004, 29(2):95-98.
- 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 ( Pt 3):595-600.

- Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU: Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and phylogenetic tree. *J Clin Microbiol* 1991, 29(9):1765-1772. extension of epidemiological studies and construction of a
- Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H: Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J Gen Virol* 2000, 81(Pt 8):1975-1981.
- Kuzman M, Simetin IP, Frenelić IP: Early sexual intercourse and risk factors in Croatian adolescents. *Coll Antropol* 2007, 31(2): 121-30.
- López-Revilla R, Martínez-Contreras LA, Sánchez-Garza M: Prevalence of highrisk human papillomavirus types in Mexican women with cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. *Infect Agent Cancer* 2008, 3(1):3.
- López-Revilla Rubén, Pineda Marco A, Ortiz-Valdez Julio, Sánchez-Garza Mireya, Riego Lina: Human papillomavirus type 16 variants in cervical intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma in San Luis Potosí City, Mexico. *Infect Agent Cancer*. 2009, 4: 3.
- Munger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, Grace M, Huh K. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004, 78(21):11451-11460.
- Muñoz N, Bosch X, De San José S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ: International for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Eng J Med* 2003, 348, 518-527.
- Ordóñez RM, Espinosa AM, Sánchez-González DJ, Armendariz-Borunda J, Berumen J: Enhanced oncogenicity of Asian-American human papillomavirus 16 is associated with impaired E2 repression of E6/E7 oncogene transcription. *J Gen Virol* 2004, 85(Pt 6):1433-1444.
- Parkin Max D, Bray Freddie, Ferlay J, Pisani Paola: Global Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005, 55:74-108
- Shuman S: Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991, 88(22):1040-8.
- Shuman, S: Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase. *J Biol Chem* 1994, 269, 32678-32684.
- Smith JS, Herrero R, Bosetti C, Muñoz N, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al: Herpes simplex virus-2 as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 2002, 94(21): 1604-13.
- Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, Vollmer N, Menton S. Menton M, Dietz K, Wallwiener D, Kandolf R, Bültmann B: Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 Nested Multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2004, 42(7):3176-84.
- Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Muñoz N, Bosch FX, Peto J, Wheeler CM: Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* 1996, 70(5):3127-3136.

Stewart AC, Graviti PE, Cheng S, Wheeler CM: Generation of Entire Human Papillomavirus Genomes by Long PCR: Frequency of Errors Produced During Amplification. *Genome Res* 1995, 5: 79-88

Stöppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J: Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 1996, 70(10):6987-6993.

Veress G, Szarka K, Dong XP, Gergely L, Pfister H: Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 1999, 80 (Pt 4):1035-1043.

Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999, 189(1):12-9.

Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA: Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* 1997, 35(1):11-19.

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

Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB: Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997, 89(11):796-802.

Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM: Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997, 71(3):2463-2472.

Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA: Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments. *J Virol* 1995, 69(12):7743-7753.

Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M: Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998, 58(4):829-833.

zur Hausen H: Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol* 1977, 78: 1-8.

**Tabla 1. Oligonucleótidos empleados por Stewart et al (1995)**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>T<sub>m</sub></b>
PEG07	5'GGGGTCTAGAGGATCCCATGTACCAATGTTGCAGTAAATCCAGGTGA	50.4
PEG12	5'GGGGGCGCCGCGGATCCTTGCCCCAGTGTCCCCTATAGGTGGTTTG	

**Tabla 2. Oligonucleótidos empleados para generar el amplicón  $\beta$ -globina (8,079 pb)**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Posición</b>	<b>%GC</b>	<b>Ta</b>
Glob8k-F	5'AACTAATGAAACCCTGCTT	5, 203, 323	36.8	56.6
Glob8k-R	5'CTTATCCCCTTCCTATGAC	5, 211, 401	47.4	

**Tabla 3. Oligonucleótidos empleados para amplificar el genoma completo de VPH16 (7,904 pb)**

<b>Nombre</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Posición</b>	<b>%GC</b>	<b>Tm</b>
VPH16-F	5'ACTACAATAATTCATGTATAAACTAAGGGCGTAAC	1	30.6	59.6
VPH16-R	5'TTAGTATTATTATATAAGTTGCTTGTAATGTGTAACCCA	7904	25	



**Tabla 4. Componentes de la mezcla de L-PCR (50  $\mu$ L)**

<b>Componente</b>	<b>Vol (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Concentración final</b>
Agua	26.8	---
Buffer 11 XL 3.3 $\times$	15.2	1 $\times$
Mg(OAc) <sub>2</sub> 25 mM <sup>a</sup>	2.5	1.25 mM
dNTP's 10 mM c/u	1	0.2 mM
Oligos Glob8k-F/R 10 o VPH16-F/R <sup>a</sup> 10 $\mu$ M c/u	2	0.4 $\mu$ M
rTth polimerasa, XL 2 U/ $\mu$ L	0.5	1 U
DNA problema	2	50 ng

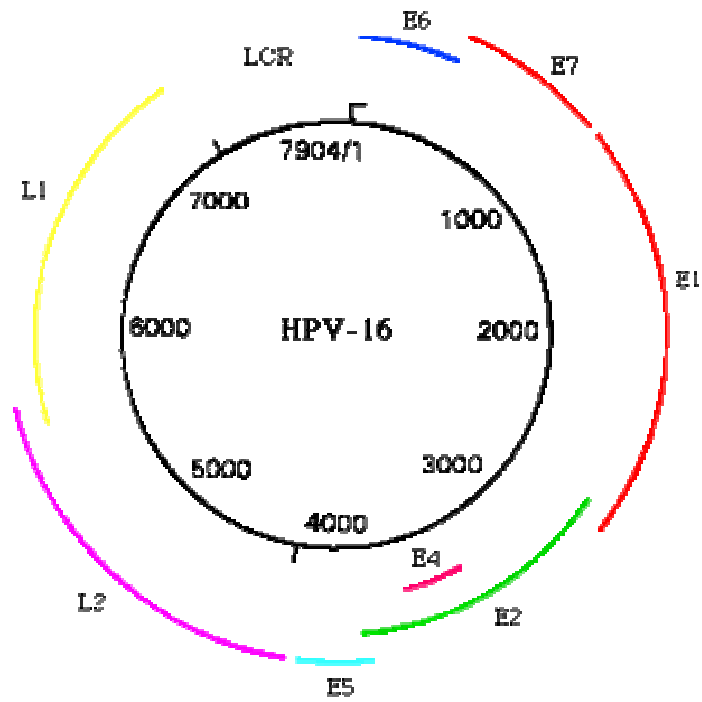
<sup>a</sup> Tricina, acetato de potasio, glicerol y DMSO.

<sup>b</sup> Parejas empleadas para  $\beta$ -globina y VPH16, respectivamente.

**Tabla 5. Programa del termociclador**

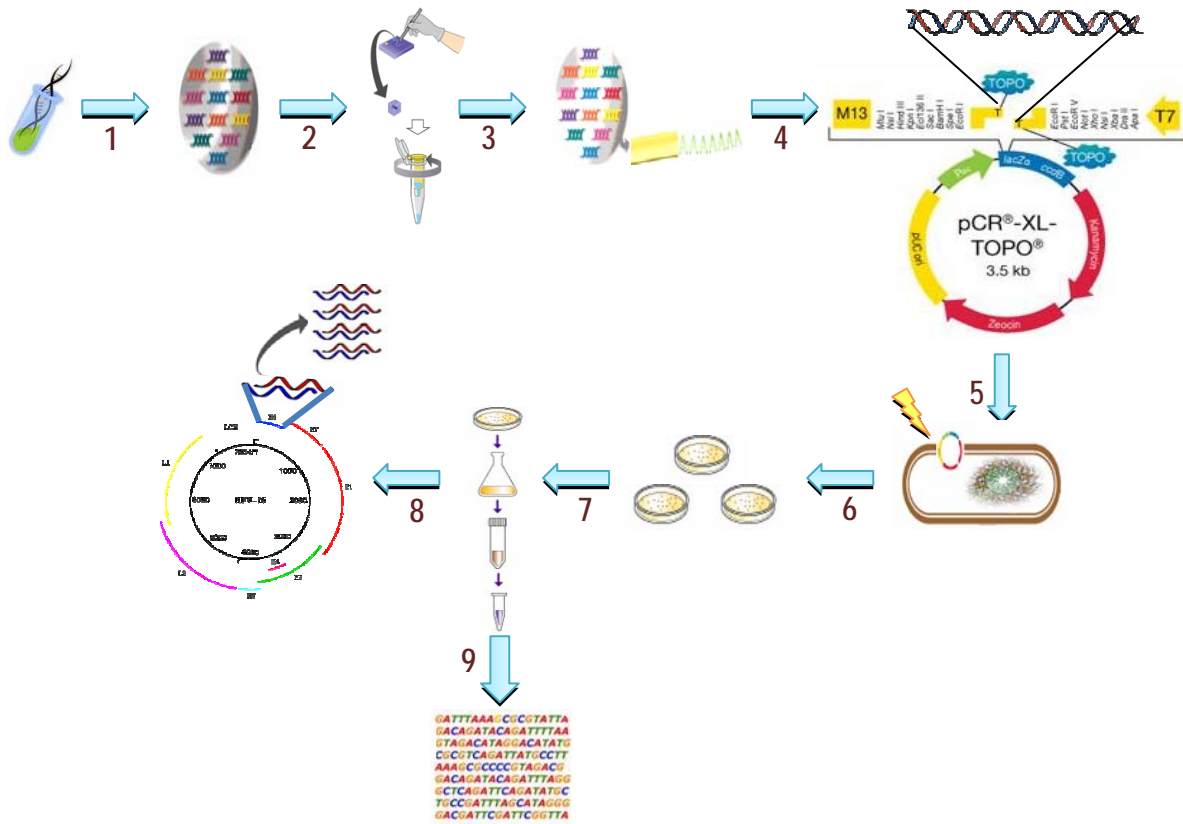
<b>Etapa</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Desnaturalización inicial	94°C	15 seg.
40 ciclos(7.5 h)		
Desnaturalización	94°C	15 seg.
Alineamiento	56.6/59.6°C <sup>a</sup>	1 min
Extensión	68°C	10 min
Extensión final	72°C	10 min

<sup>a</sup> Temperaturas para  $\beta$ -globina y VPH16, respectivamente.



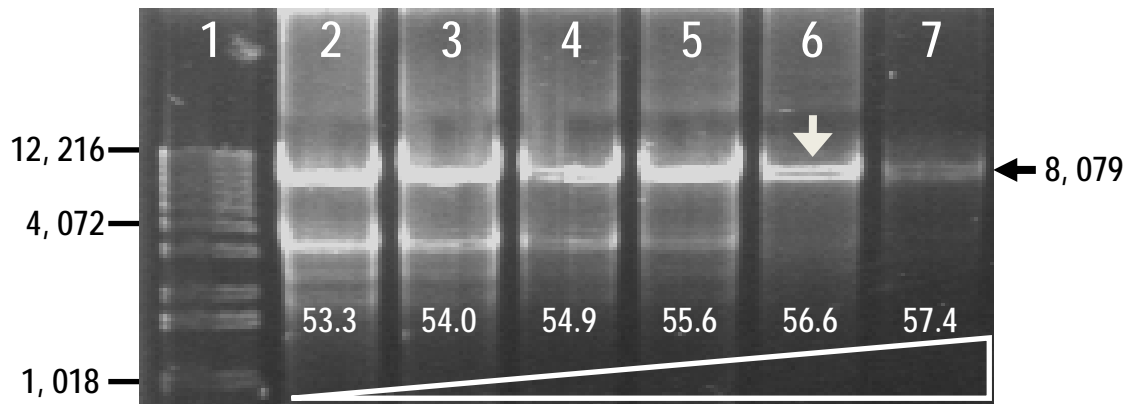
**Figura 1. Mapa del genoma de VPH16**

Tomado de: Cortés Gutiérrez EI y Leal Garza CH (2001).



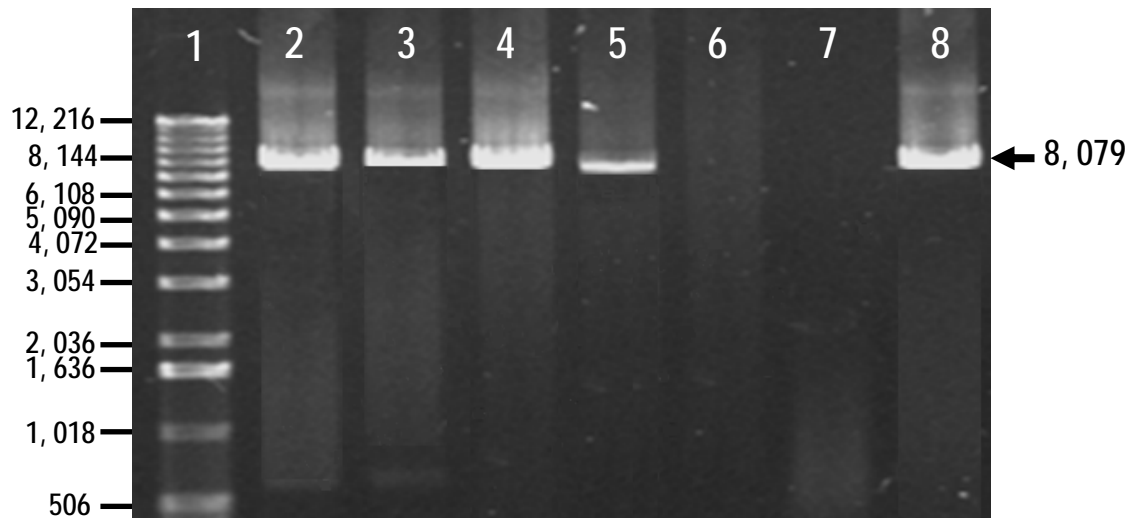
**Figura 2. Estrategia para clonar el amplicón VPH16-8K de raspados cervicales**

1, Obtención del amplicón VPH16-8K mediante L-PCR de muestras VPH16 positivas con la pareja de oligonucleótidos VPH16-F/R. 2, Purificación del producto VPH16-8 kb por escisión de la banda del gel de agarosa. 3, Adición de tallo-A en los extremos incubando 1 hr con *Taq* DNA polimerasa y dATP a 70°C. 4, Ligación al vector TOPO-XL. 5, Transformación por electroporación de células de *E. coli* TOP 10 F' electrocompetentes; parámetros: 25 µF, 400 Ω, 2.5 KV. 6, Obtención de clonas transformantes mediante dos pases sucesivos de colonias aisladas en placas de agar LB con kanamicina (30 mg/mL). 7, Propagación de la clona CML20 y purificación del plásmido pCML20 (midiprep). 8, Tipificación de la clona CML20 con el método de Sotlar et al. (2004). 9, Secuenciación y análisis del plásmido pCML20.



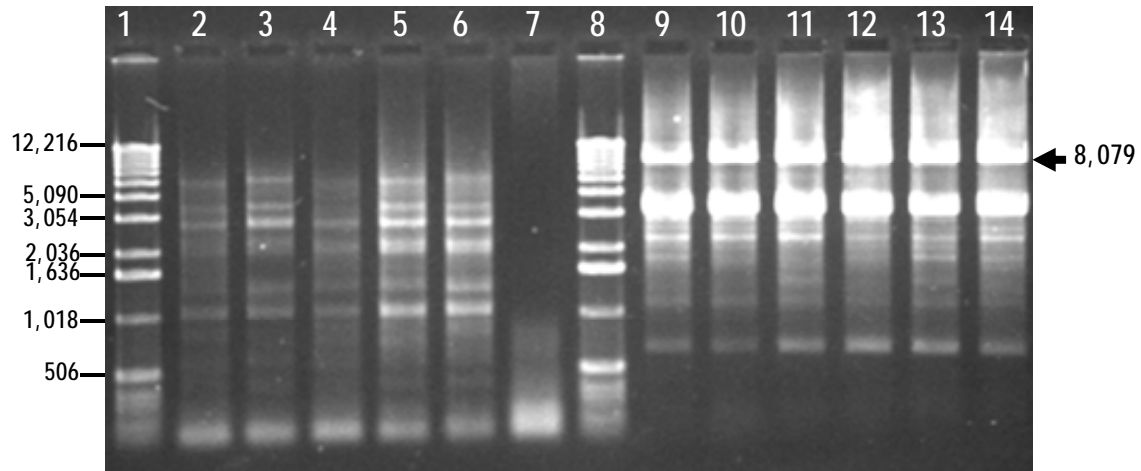
**Figura 3. Gradiente de temperatura de alineamiento para amplificar el producto  $\beta$ -globina-8 kb**

Electroforesis en TAE-agarosa 1%; corrida a 85 V, 1 h. 1, Escalera 1 kb. 2-7, Temperaturas de alineamiento ( $^{\circ}$ C). La flecha negra indica el tamaño del amplicón esperado y la flecha blanca la temperatura óptima encontrada.

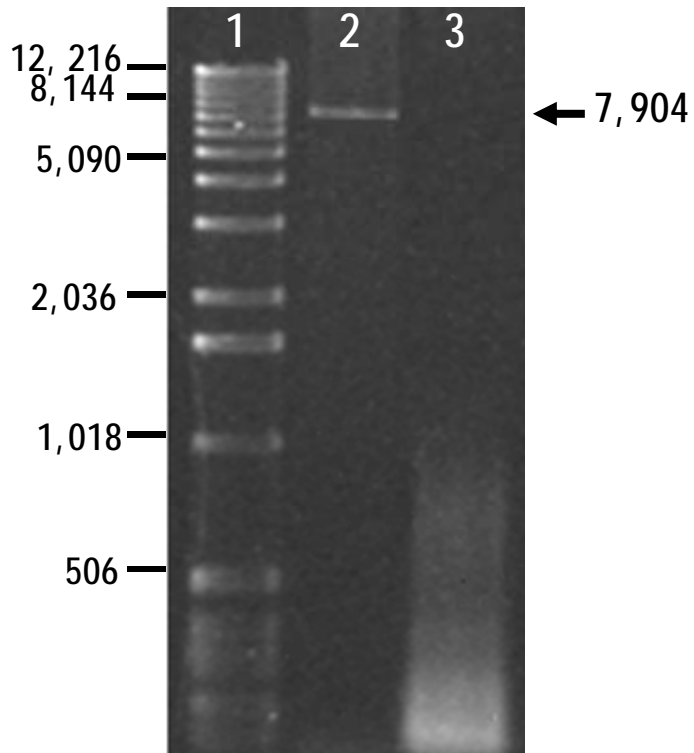


**Figura 4. L-PCR de raspados VPH16-positivos con la pareja Glob8k**

Electroforesis en TAE-agarosa 1%, corrida: 85 V, 1 h. 1, Escalera 1 kb. 2-5, Muestras VPH16 positivas. 6 y 7, Muestras VPH16 positivas no amplificables. 8, Control positivo: DNA de sangre. La flecha de la derecha indica el tamaño del amplicón esperado.

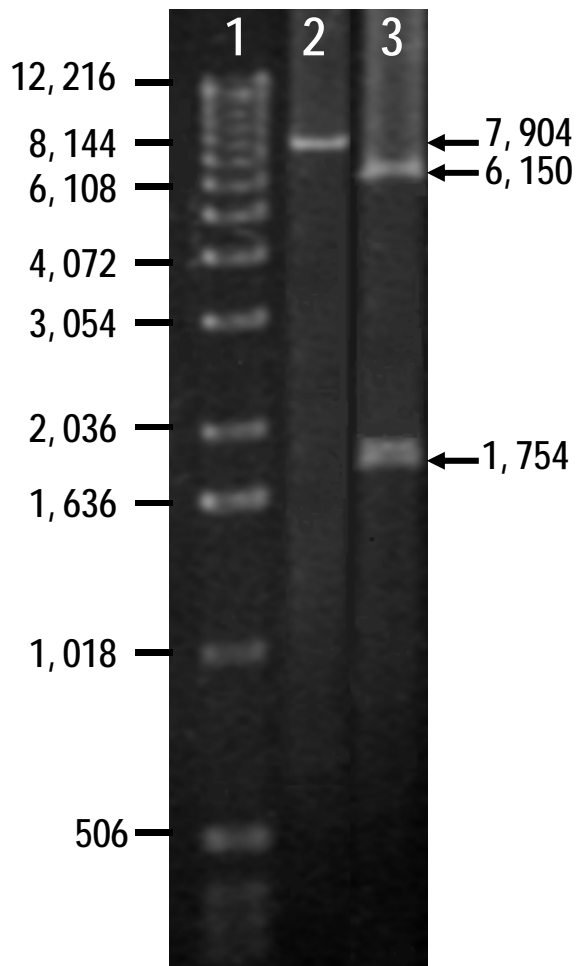


**Figura 5. L-PCR de raspados VPH16-positivos con las parejas PEG07/12 y Glob8k**  
Electroforesis en TAE-agarosa 1%, corrida: 85 V, 1 h. 1 y 8, Escalera 1 kb. 2-6, Muestras VPH16 positivas amplificadas con la pareja PEG07/12 para VPH. 7, Control negativo. 9-13, Muestras VPH16 positivas amplificadas con la pareja Glob8k. 14, Control positivo: DNA de sangre. La flecha de la derecha indica el tamaño del amplicón esperado.



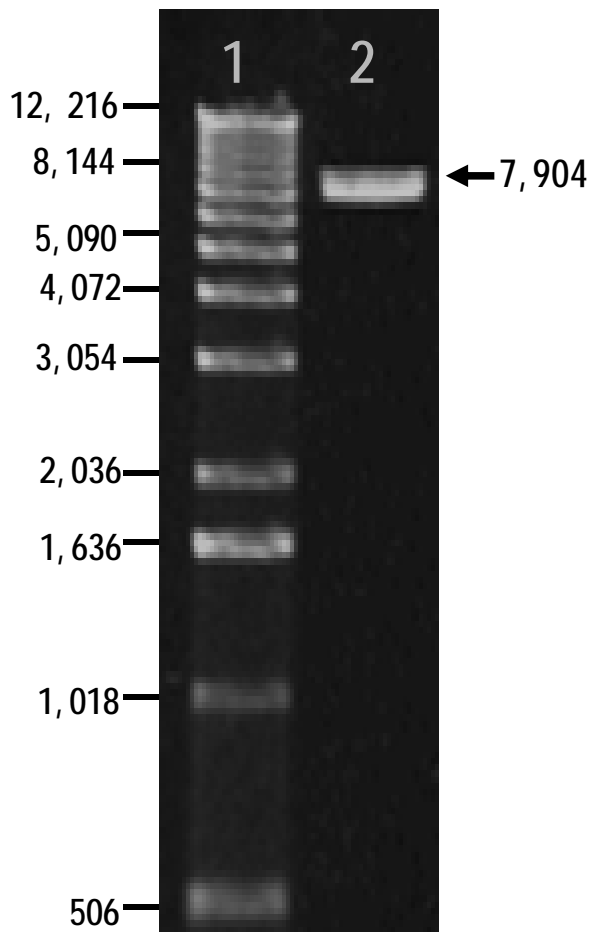
**Figura 6. L-PCR de raspados VPH16-positivos con la pareja VPH16-F/R**  
Electroforesis en TAE-agarosa 1%, corrida: 85 V, 1 h. 1, Escalera 1 kb. 2, Muestra VPH16 positiva que generó el amplicón VPH16-8 kb esperado. 3, Control negativo (Agua).





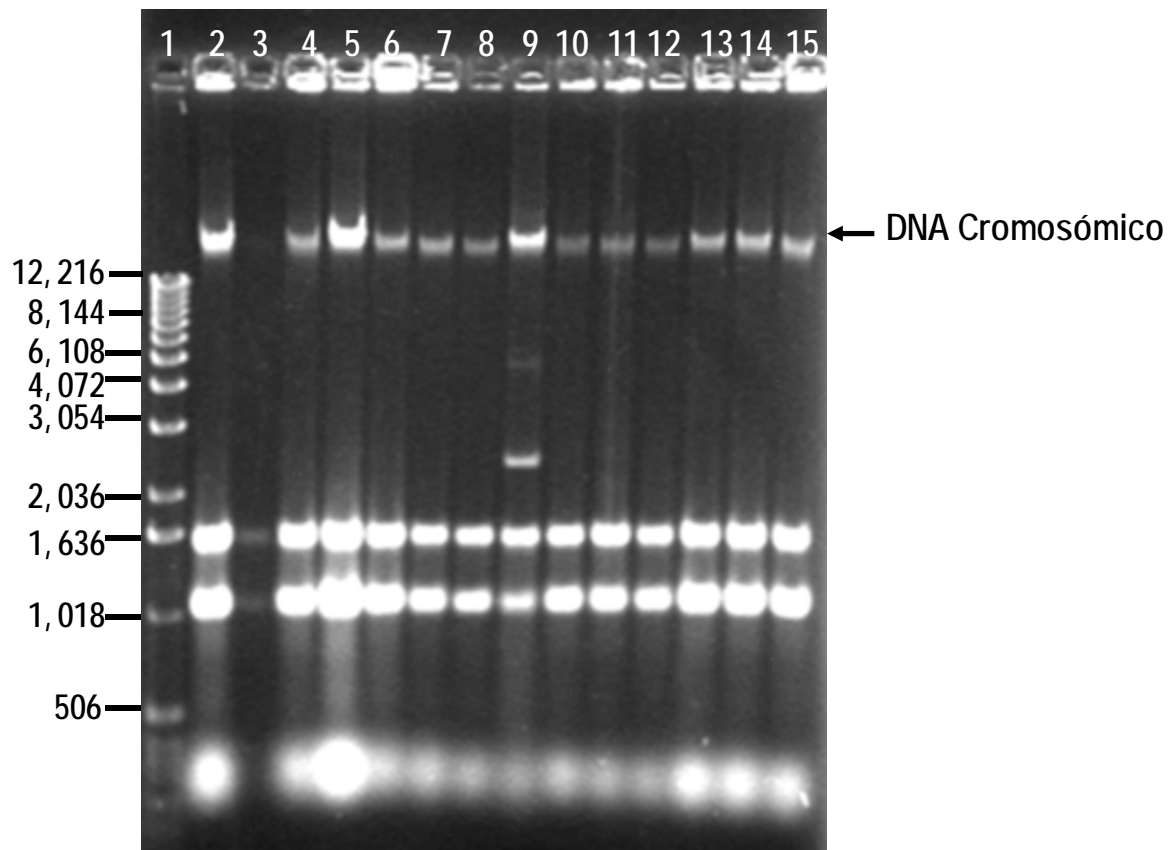
**Figura 7. Restricción del amplicón VPH16 con *Bam* HI**

Electroforesis en TAE-agarosa 1%, corrida: 85 V, 1 h. 1, Escalera de 1 kb. 2, Amplicón intacto de 8 kb obtenido con la pareja de oligonucleótidos VPH16-F/R. 3, Fragmentos del amplicón VPH16 8 kb generados con *Bam* HI. Las flechas indican los tamaños del amplicón intacto y de los fragmentos esperados con *Bam* HI.



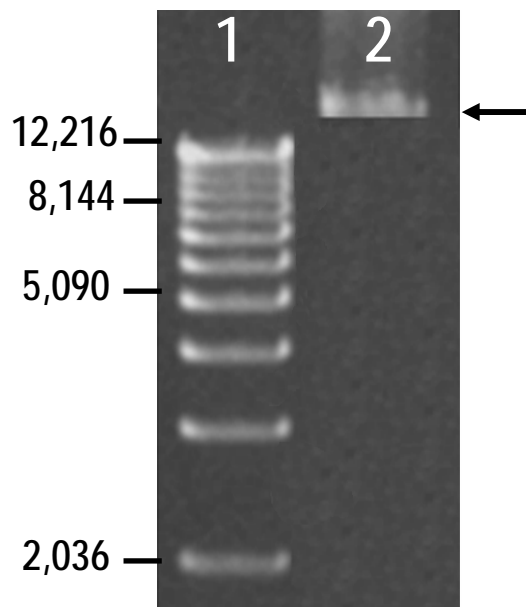
**Figura 8. Purificación en gel del amplicón de 8kb**

Electroforesis en TAE-agarosa 1%, corrida: 85 V, 1 h. 1, Escalera de 1 kb. 2, Amplicón intacto de 8 kb después de la purificación en gel.



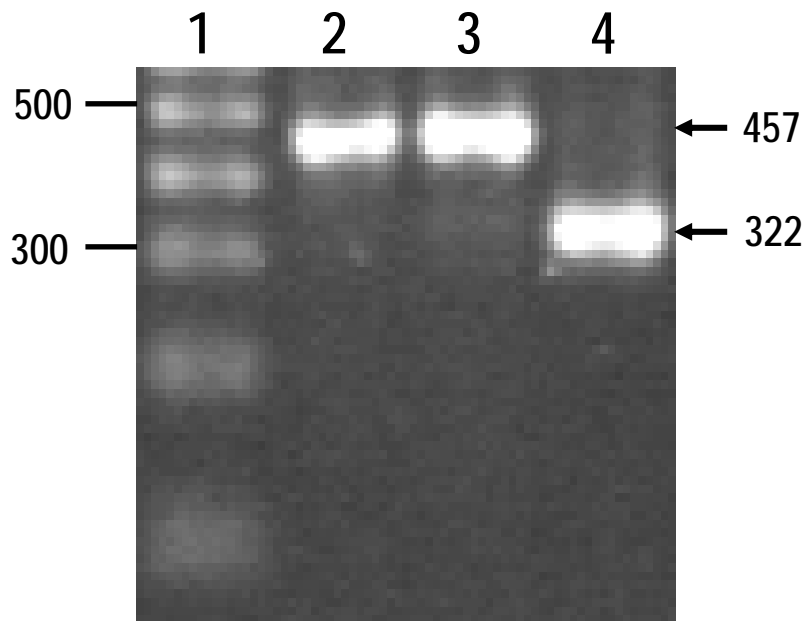
**Figura 9. Detección ultrarrápida de colonias transformantes**

Electroforesis en TAE-agarosa 1%, corrida: 85 V, 1 h. 1, Escalera de 1 kb 2-8 y 10-15, Clonas sin plásmido visible. 9, Clona portando un plásmido con inserto pequeño.



**Figura 10. Plásmido pCML1620 purificado**

Electroforesis en TAE-agarosa 1%, corrida: 85 V, 1 h. 1, Escalera de 1 kb 2, Plásmido purificado de la clona CML1620 (Vector TOPO XL con un inserto de 8 kb generado con la pareja VPH16-F/R).



**Figura 11. Tipificación de CML1620 mediante PCR multiplex anidada**

1, Escalera de 100 pb. 2, Clona CML1620, positiva para VPH16. 3, Control positivo: DNA de SiHa (VPH16). 4, Control Positivo: DNA de HeLa (VPH18).