

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



***DETERMINACIÓN DE LA CARGA VIRAL DE  
HPV-16 EN MUESTRAS CERVICALES DE  
MUJERES CON LESIONES DE ALTO  
Y BAJO GRADO***

**Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de  
Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular**

***MONSERRAT DANIELA BALANDA APEY***

**Director de Tesis: Dr. Eugenio Ramírez Villalobos**

**Santiago-CHILE**

**Noviembre 2015**

## **FINANCIAMIENTO**

Los recursos financieros para el desarrollo esta tesis fueron íntegramente aportados por el presupuesto anual de investigaciones desarrolladas por la Sección Virus Oncogénicos, del Departamento Biomédico del Instituto de Salud Pública de Chile.

## ÍNDICE GENERAL

FINANCIAMIENTO	2
ÍNDICE GENERAL	3
ÍNDICE DE TABLAS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
1. Infección con Virus Papiloma Humano y Cáncer Cérvico Uterino	9
2. Diagnóstico de laboratorio de la infección por HPV	15
3. Biomarcadores de pronóstico de infección por HPV	16
II. HIPÓTESIS	17
III. OBJETIVO GENERAL	17
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
V. METODOLOGÍA	18
1. Muestras clínicas	18
2. Líneas celulares	19
3. Extracción de DNA de líneas celulares y muestras clínicas	20
4. Amplificación del DNA mediante PCR convencional	20
5. Electroforesis en gel de agarosa	22
6. Clonamiento de fragmentos de genes L1 y E7	22
7. Detección y genotipificación de HPV en muestras clínicas de pacientes	24
8. Cuantificación de la carga viral de HPV mediante PCR en tiempo real	25
9. Análisis estadístico	26
VI. RESULTADOS	27
1. Pacientes	27
2. Clonamiento en vector plasmídico de los amplicones de los genes L1 y E7 de HPV-16	28
3. Implementación del método de PCR en tiempo real para la amplificación de fragmentos de los genes E7 y L1 de HPV-16	29
a) Implementación de un PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen E7	29
b) Implementación de un PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen L1	33
c) Implementación de un PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen HBB	36
4. Evaluación de la correlación entre los hallazgos moleculares y la información clínica-epidemiológica de las pacientes infectadas con HPV-16	40
VII. DISCUSIÓN	44
VIII. CONCLUSIONES	49
IX. BIBLIOGRAFÍA	50
ANEXO 1	54

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Partidores utilizados en las diferentes reacciones de PCR	21
Tabla 2: Programas térmicos utilizados en la amplificación de PCR convencional	22
Tabla 3: Programas térmicos utilizados en la amplificación de PCR tiempo real	25
Tabla 4: Características epidemiológicas de las 60 pacientes evaluadas	27
Tabla 5: Valores de $C_T$ obtenidos al amplificar un fragmento del gen E7	32
Tabla 6: Valores de $C_T$ obtenidos al amplificar un fragmento del gen L1	36
Tabla 7: Valores de $C_T$ obtenidos al amplificar un fragmento del gen HBB	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 : Representación de la estructura del HPV	9
Figura 2 : Esquema representativo del genoma de HPV	10
Figura 3 : Esquema del reconocimiento, unión e integración de HPV a la célula	12
Figura 4 : Progresión de la infección por HPV	13
Figura 5 : Mecanismos de patogénesis celular mediada por HPV	14
Figura 6 : Diagrama de flujo para la selección de muestras	19
Figura 7 : Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de genes L1 y E7	28
Figura 8 : Implementación de un PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen E7	30
Figura 9 : Curva de disociación obtenida al amplificar un fragmento del gen E7 de HPV-16 y electroforesis de producto de PCR a partir de DNA extraído de células SiHa	31
Figura 10: Curva de calibración del número de copias del plasmidio E7 de HPV-16 según el $C_T$	33
Figura 11: Implementación de PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen E7 de HPV-16	34
Figura 12: Curva de disociación obtenida al amplificar un fragmento del gen L1 de HPV-16 y electroforesis de producto de PCR a partir de DNA extraído de células SiHa	35
Figura 13: Curva de calibración obtenida con el plasmidio L1 de HPV16	36
Figura 14: Curvas de amplificación obtenidas al amplificar un fragmento del gen HBB a 55°C y 60°C	37
Figura 15: Curvas de disociación obtenidas al amplificar un fragmento del gen HBB	38
Figura 16: Curvas de calibración obtenidas al amplificar un fragmento del gen HBB para temperaturas de apareamiento 55°C (rojo) y 60°C (azul)	40
Figura 17: Correlación de la carga viral de HPV-16 obtenida mediante L1 y E7	41
Figura 18: Relación de la carga viral cuantificada mediante el marcador L1 y el grado de lesión en las muestras clínicas de las pacientes	42
Figura 19: Relación de la carga viral cuantificada mediante el marcador E7 el grado de lesión en las muestras clínicas de las pacientes	43

## ABREVIATURAS

HPV	: Virus Papiloma Humano
HPV-16	: Virus Papiloma Humano tipo 16
L1 y L2	: Genes estructurales virales de expresión tardía
E1, E2, E4, E5, E6 y E6	: Genes involucrados en la replicación viral y oncogénesis de expresión temprana
LCR	: Región viral regulatoria no codificante
HPV-BR	: Virus Papiloma Humano de bajo riesgo
HPV-AR	: Virus Papiloma Humano de alto riesgo
HSPGs	: Proteoglicanos de Heparán Sulfato
DNA	: Ácido Desoxirribonucleico
pRB	: Proteína del Retinoblastoma
NIE I/II/III	: Neoplasia Intraepitelial grado I/II/III
SNP	: Polimorfismo de un sólo nucleótido
Pap	: Papanicolaou
ASCUS	: Células escamosas atípicas de significancia indeterminado
ASC-H	: Células escamosas atípicas que no pueden excluir lesiones de alto grado
LIBG	: Lesión Intraepitelial de Bajo Grado
LIAG	: Lesión Intraepitelial de Alto Grado
RNA	: Ácido Ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	: RNA mensajero
PCR	: Reacción de la polimerasa en cadena
PCR-RLB	: Hibridación Reversa en Línea
PBS	: Tampón fosfato salino
GuSCN	: Tiocianato de Guanidina
TBE	: Tampón Tris Borato EDTA
EDAC	: 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida-HCl
HBB	: Gen que codifica la proteína β-Globina Humana
HLA	: Antígeno Leucocitario de Humano
C <sub>T</sub>	: Ciclo umbral
pb	: Pares de Bases
ufc	: Unidad formadora de colonia
TM	: Temperatura de disociación
RLU	: Unidades relativas de luz
ISP	: Instituto de Salud Pública de Chile

## RESUMEN

La infección de transmisión sexual más común a nivel mundial, tanto en hombres como en mujeres es la producida por el Virus Papiloma Humano (HPV). Los diferentes HPV que afectan la zona anogenital se dividen en dos grupos: bajo y alto riesgo carcinogénico. La infección con HPV-AR ha sido detectada en más del 99,7% de los casos de cáncer cérvico-uterino. Este cáncer ocupa el sexto lugar dentro de las neoplasias malignas femeninas, produciendo alrededor de 600 muertes al año en Chile.

En la actualidad no se dispone de biomarcadores adecuados para estimar el pronóstico de la infección viral en los pacientes. Por lo anterior, en esta investigación se evaluó la utilidad de la medición de la carga viral como predictor de progreso de la infección en mujeres infectadas con HPV-16. La hipótesis planteada fue que las pacientes infectadas con HPV-16 y con lesiones cervicales de alto grado presentan una mayor carga viral cuantificada a través de la amplificación de segmentos de los genes L1 y E7 en comparación con aquellas infectadas y con lesiones de bajo grado.

El estudio se realizó con muestras cervicales de 60 mujeres controladas ginecológicamente en el Hospital San Juan de Dios. Todas las pacientes presentaban un examen citológico alterado: 40 estaban infectadas con HPV-16 y 20 fueron negativas a la presencia del virus. En todas las muestras se cuantificó la carga de DNA viral mediante PCR en tiempo real.

El 28,3%, 18,3% y 53,3% de las pacientes presentaron lesiones NIE I, NIE II y NIE III, respectivamente. En las pacientes infectadas con HPV-16 se determinó que la mediana de la carga viral del ensayo utilizando L1 en LIBG es 1,4 veces mayor en comparación con la obtenida en las LIAG. La carga viral obtenida al amplificar un segmento del gen E7 se encontró que es 1,5 veces mayor en LIBG en comparación con LIAG. Además, los niveles de los amplicones de ambos genes en los diferentes grados de lesión mostraron una correlación lineal positiva. Estos resultados muestran que en LIBG existe una mayor carga viral en comparación con aquellas con lesiones LIAG.

## ABSTRACT

The most common worldwide sexually transmitted disease in both men and women is Human Papillomavirus (HPV). Different HPV infect the anogenital area and they are divided into two groups: low and high carcinogenic risk. High risk HPV have been found in 99,7% of cervical cancer cases. This cancer ranks sixth in female malignancies, causing about 600 deaths a year in Chile.

Currently there are no good biomarkers to predict the viral infection in patients. Therefore, this study evaluated the usefulness of viral load as a predictor of disease progression in HPV-16-infected women. The hypothesis was that patients infected with HPV-16 and with high-grade cervical lesions have a higher viral load quantified through the amplification of segments of L1 and E7 genes compared to those infected with low-grade lesions.

We studied vaginal samples of 60 women attending a gynecological control at San Juan de Dios Hospital. All patients had an altered cytology testing: 40 of them were HPV-16 infected and 20 non infected. Viral load of L1 and E7 genes were quantified in all samples by real time PCR. The overall detection of cervical intraepithelial neoplasia NIEI, NIEII and NIEIII was 28,3%, 18,3% and 53,3%, respectively. In LIBG patients infected with HPV-16 it was determined that the median viral load assay using L1 is 1,4 times higher compared with that obtained in LIAG. The viral load obtained by amplifying a segment of the E7 gene was found to be 1,5 times higher in patients with LIBG than LIAG. Furthermore, levels of L1 and E7 genes show a positive lineal correlation in all cervical lesions. These results indicate that lesions with low severity have higher viral load than high severity



## I. INTRODUCCIÓN

### 1. Infección con Virus Papiloma Humano y Cáncer Cérvico Uterino

La infección de transmisión sexual más común a nivel mundial, tanto en hombres como en mujeres es la causada por el Virus Papiloma Humano (HPV, del inglés *Human Papillomavirus* [1]. Se estima que cerca del 75% de la población sexualmente activa se infecta con HPV en algún momento de su vida.

El Virus Papiloma infecta el epitelio de una gran variedad de animales, donde puede causar neoplasias o persistir de forma asintomática [2]. El HPV pertenece a la familia *Papillomaviridae*, es relativamente pequeño (52 a 55 nm de diámetro), sin envoltura, de estructura icosaédrica y presenta una cápside compuesta por 72 capsómeros pentaméricos, en la cual se encuentran al menos dos proteínas, L1 de aproximadamente 55 KD y que representa el 80% de las proteínas totales de la cápside y L2 de aproximadamente 70 KD (Figura 1).

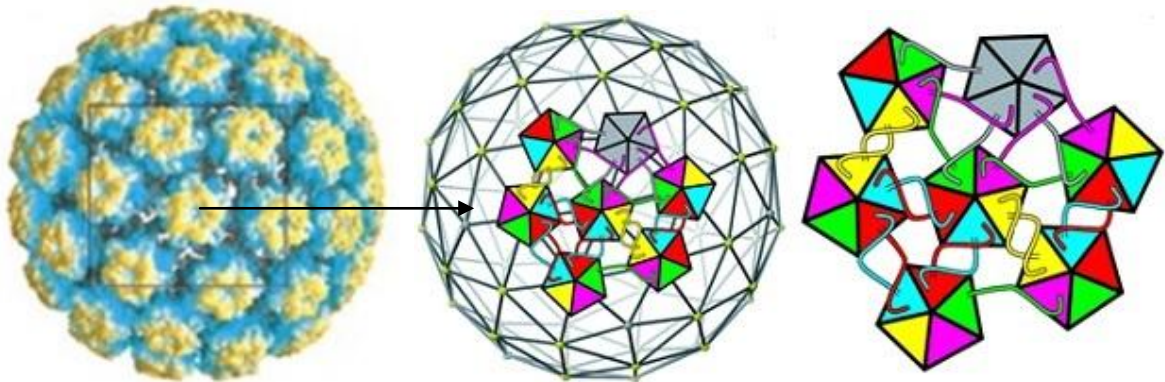


Figura 1: Representación de la estructura del HPV. Se puede observar la cápside formada por 72 capsómeros pentaméricos de L1 (adaptado de [3])

El genoma viral consiste en una sola molécula de DNA de doble hebra circular de aproximadamente 8000 pb, que se divide en tres regiones: i) región regulatoria no codificante (LCR) de 400 a 1000 pb aproximadamente, ii) región temprana (*early*, en inglés) donde se encuentran los genes E1, E2, E4, E5, E6 y E7, los que están involucrados en la replicación viral y la oncogénesis, iii) región tardía (*late*, en inglés), la cual codifica las proteínas estructurales L1 y L2 [4] (Figura 2).

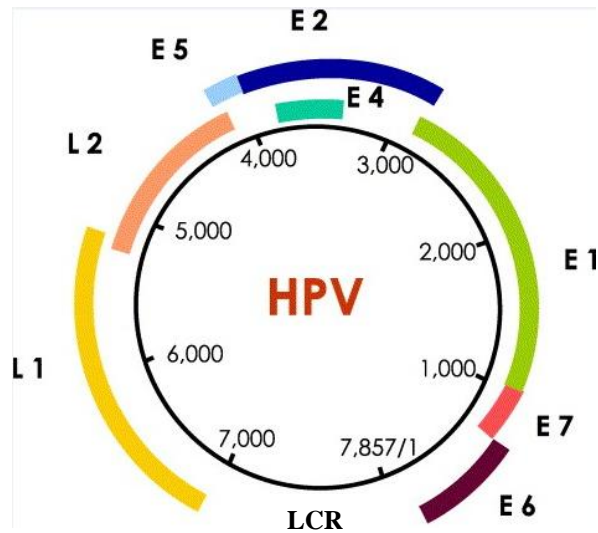


Figura 2: Esquema representativo del genoma de HPV (adaptado de [5]).

El gen L1 es el más conservado dentro del genoma viral y se utiliza para la identificación y clasificación de los genotipos virales. Un genotipo se diferencia de otro cuando difieren entre sí en más de un 10% de la secuencia del gen L1 [6]. Se han encontrado cerca de 200 tipos diferentes de HPV, los que infectan las células de la capa basal del epitelio cutáneo y mucoso. Éstos se clasifican en cutáneos, los que pertenecen principalmente al género *Beta-papillomavirus*, capaces de infectar la piel de manos y pies; y mucosos, predominantemente del género *Alpha-papillomavirus*, capaces de infectar la boca, garganta, tracto respiratorio o epitelio anogenital [4]. Esta diferencia de tropismo se podría deber a la diferencia de carga eléctrica que presenta la proteína L1 entre los géneros *Alpha* y *Beta-papillomavirus*, lo que afectaría la interacción entre L1 y las moléculas de heparán sulfato que actúan como receptores celulares para la entrada del virus a la célula [7]. Otros de los factores que podría afectar el tropismo de HPV son los diferentes sitios de unión específica a factores epiteliales que presenta la región LCR del genoma viral, lo que afectaría la replicación viral dentro de la célula infectada [8].

Los HPV que infectan la zona anogenital se dividen en dos grupos: i) aquellos que tienen bajo riesgo carcinogénico o Bajo Riesgo (HPV-BR), por ejemplo HPV-6, 11, 42 y 54, asociados a verrugas genitales y condilomas acuminados y; ii) aquellos que tienen alto riesgo carcinogénico o Alto Riesgo (HPV-AR), por ejemplo HPV-16, 18, 31, 33 y 45, asociados a lesiones cervicales intraepiteliales de bajo grado, donde las células atípicas están principalmente confinadas en el tercio inferior del epitelio, lesiones de

alto grado donde las células displásicas se distribuyen tanto en las capas basales como superiores del epitelio y cáncer invasor [9].

El cáncer de cuello uterino es la segunda causa de muerte en mujeres alrededor del mundo. Se estima que cada año hay aproximadamente 530.000 casos nuevos diagnosticados y sobre 270.000 muertes, de las cuales más del 85% ocurren en países de bajos y medianos ingresos [10]. En Chile, el cáncer del cuello del útero ocupa el cuarto lugar dentro de las neoplasias malignas, con una tasa de mortalidad de 8,7 por cada 100.000 habitantes, lo que se traduce en alrededor de 600 muertes anuales en mujeres mayores de 15 años [11]. El DNA de HPV-AR ha sido detectado en más del 99,7% de los casos de cáncer cérvico-uterino, demostrando la fuerte asociación existente entre el cáncer y la infección con HPV de alto riesgo [12].

La infección con HPV requiere que el virus acceda hasta las capas basales del epitelio escamoso estratificado para poder infectar a las células que se encuentran en división celular. Las células de las capas basales sólo se encuentran expuestas debido a la existencia de microabrasiones en el epitelio. La unión entre HPV y la célula se realiza mediante reconocimiento de L1 vía Proteoglicanos de Heparán Sulfato (*HSPGs*, por su sigla en inglés de *Heparan Sulfate Proteoglycans*), los que se encuentran localizados en la superficie de las células basales [13, 14]. Los HSPGs son proteínas que se encuentran tanto en la superficie celular como en la matriz y están involucrados en una gran variedad de actividades biológicas incluyendo organogénesis, angiogénesis, cicatrización de heridas, etc. Por otra parte, éstos también funcionan como receptores para una gran variedad de patógenos virales y bacterianos [14, 15]. Luego de la unión entre la membrana y HPV se produce un cambio conformacional en la cápside, específicamente en la proteína L2, el cual es mediado por furina [16]. Un segundo receptor que estaría involucrado en la internalización de HPV sería la integrina  $\alpha 6$ , ya que anticuerpos monoclonales contra esta proteína inhiben la unión de HPV a las células [15]. Se han postulado diversas estrategias involucradas en la internalización de HPV a la célula, las cuales incluyen endocitosis mediada por clatrina, endocitosis mediada por caveolas y endocitosis independiente de clatrina y caveola [15] (Figura 3).

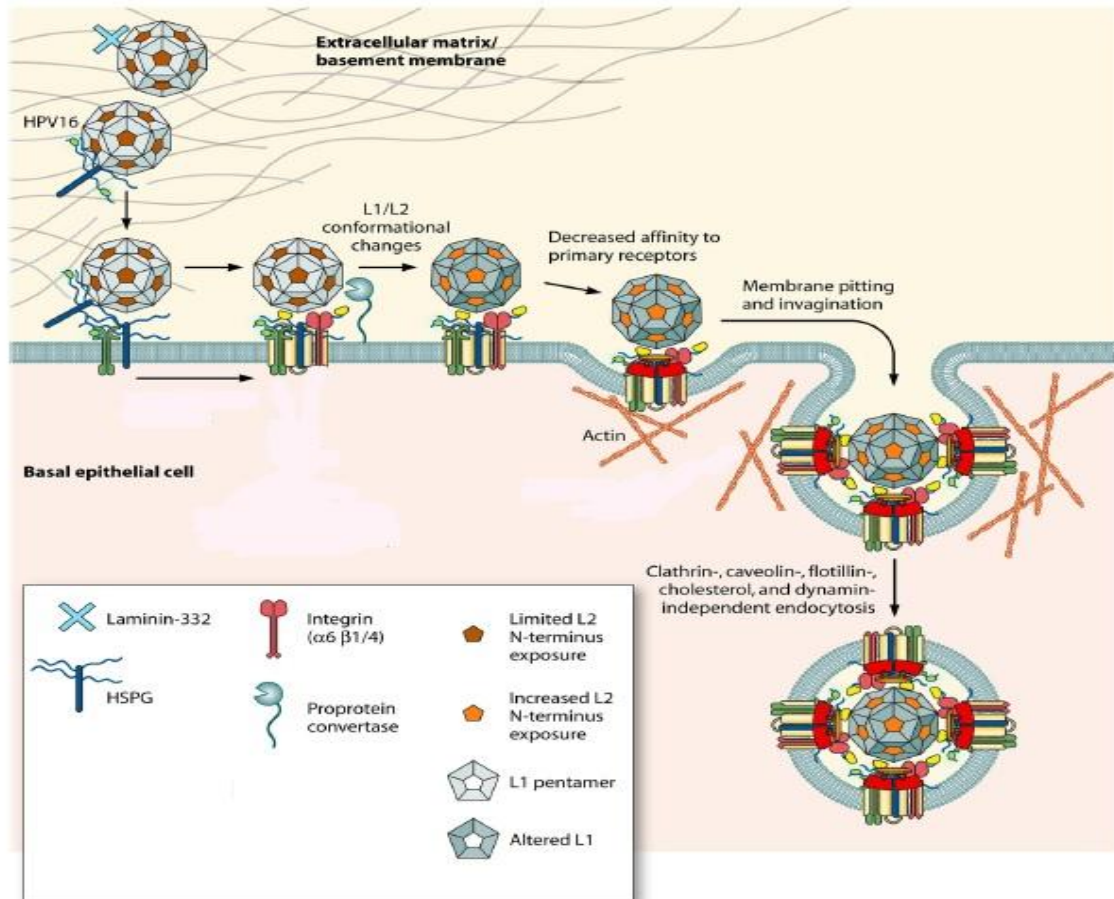


Figura 3: Esquema del reconocimiento, unión e integración de HPV a la célula. En una primera instancia ocurre la unión entre HSPGs y la cápside viral. Una vez unido L1 a la membrana, se produce el cambio conformacional de la proteína L2 y la unión al segundo receptor  $\alpha 6$  integrina. Finalmente, se produce la internalización del virus mediante endocitosis (adaptada de [14]).

Muchos virus pueden infectar y producir su progenie viral en una misma célula sin que ésta necesite diferenciarse posteriormente a la infección inicial. Sin embargo, el HPV sólo es capaz de producir progenie una vez que la célula infectada entre en etapa de mitosis y las células se diferencien *in vivo* [17]. Durante la infección, el genoma viral se encuentra en forma episomal y para poder replicarse necesita de proteínas celulares. Las células de las capas basales se encuentran en constante división, para luego diferenciarse en las capas superiores. Sin embargo, las células infectadas con HPV que se encuentra en las capas en diferenciación vuelven a entrar en etapa S del ciclo celular para producir la amplificación del genoma viral. Luego, en las capas más superficiales se sinterizan las proteínas de la cápside y posteriormente ocurre el ensamblaje del virión y su liberación. En las lesiones precancerosas, el genoma viral persiste en forma episomal. Por el contrario, en las lesiones de alto grado y carcinoma el genoma viral tiende a encontrarse en forma integrada al DNA del hospedero [17] (Figura 4).

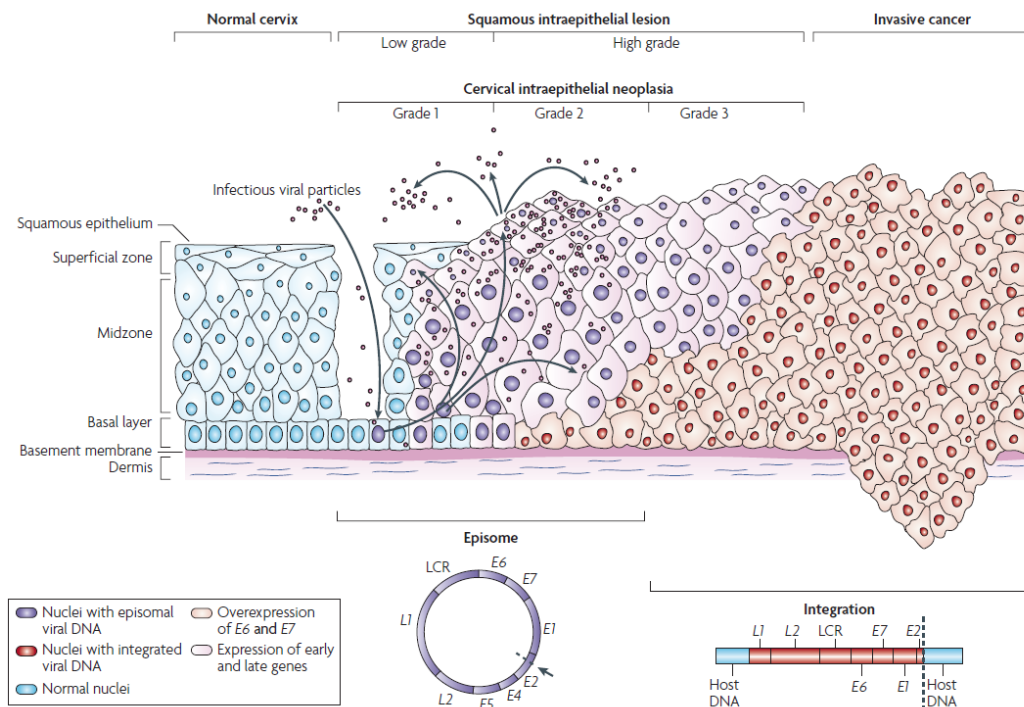


Figura 4: Progresión de la infección por HPV. El virus ingresa a las células basales por microabrasiones en el epitelio. En etapas tempranas se expresan los genes *early* del genoma viral, el cual se replica en forma episomal. En las capas medias y superiores del epitelio el genoma de HPV es amplificado y se comienzan a expresar los genes de la cápside (L1 y L2). La progresión a lesiones de mayor grado está asociada a la integración del genoma viral al DNA del hospedero, produciéndose la interrupción del gen E2, con la consecuente desregulación de E6 y E7 [18].

Los HPV-AR presentan diferentes características en comparación con los HPV-BR. En ambos casos, la expresión de las proteínas E6 y E7 está regulada por la proteína E2; sin embargo, la expresión de E2 se ve afectada durante la integración del DNA en el genoma del hospedero cuando existe infección con HPV-AR. Ésto se debe a que el gen E2 se interrumpe cuando ocurre la integración del DNA en la célula hospedera, generando una desregulación en la expresión de E6 y E7 [12] (Figura 3). Estas proteínas son descritas como oncoproteínas porque durante la infección con HPV-AR inactivan una serie de proteínas celulares, alterando el ciclo celular normal [19]. Una de las proteínas afectadas es retinoblastoma (pRB), proteína supresora de tumores a la cual se une E, produciendo la liberación del factor de transcripción E2F-1 y provocando que la célula ingrese a la fase S del ciclo celular. Otra proteína afectada es p53, a la cual se une E6 produciendo su degradación por ubiquitinación a través del proteosoma. Los cambios en la expresión de estas proteínas reguladoras afectan el control del ciclo

celular, produciendo inestabilidad genética y acumulación de mutaciones que contribuyen al desarrollo de cáncer [4, 9] (Figura 5).

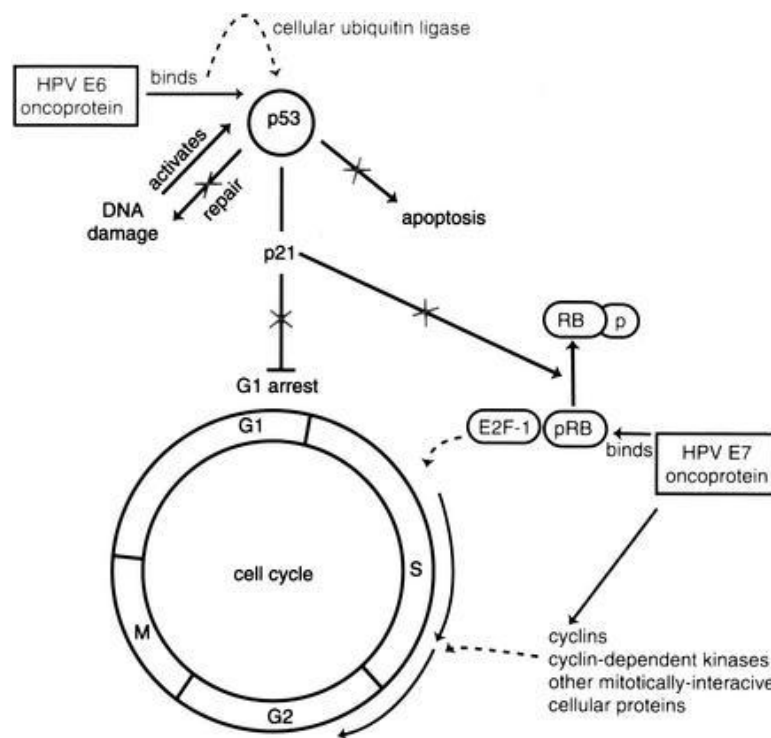


Figura 5: Mecanismos de patogénesis celular mediada por HPV. Esquematación de la unión de E6 a p53 y E7 a pRB, generando la desregulación del ciclo celular [4].

En los pacientes, aproximadamente el 70%-90% de las infecciones por HPV son eliminadas por el sistema inmune del hospedero. Sólo una pequeña proporción de éstas se establece como persistente, convirtiéndose en un factor de riesgo para la progresión a lesiones precursoras de cáncer. La manifestación clínica observada en la mayoría de los casos con infección persistente son las lesiones de bajo grado o Neoplasia Intraepitelial I (NIE I), la cual en la mayoría de los casos progresa a una citología normal. En algunos casos las infecciones persistentes pueden progresar a lesiones de alto grado o Neoplasias Intraepiteliales II/III (NIE II o III), las que son consideradas un factor precursor al desarrollo de cáncer. Algunos de los factores que pueden afectar la progresión de lesiones de bajo grado a lesiones de alto grado son el genotipo de HPV infectante, la edad avanzada de las mujeres, el hábito de fumar, inmunosupresión, factores genéticos, etc. [19]. Dentro de los factores genéticos asociado al desarrollo de cáncer que se han planteado, se encuentra el polimorfismo de un sólo nucleótido (*SNP*, por su sigla en inglés de *Single Nucleotide Polymorphism*) en el codón 72 de la proteína p53. Este SNP

involucra el cambio de una Prolina (Pro) por una Arginina (Arg), resultando una variante de p53 siete veces más susceptible a la degradación mediada por E6 en comparación con aquellas variantes que presentan Pro en esta posición, conduciendo a una mayor degradación de p53 por ubiquitinación a través del proteosoma [20].

## **2. Diagnóstico de laboratorio de la infección por HPV**

El examen citológico o Papanicolaou (Pap) es el ensayo clínico tradicionalmente empleado para pesquisar la presencia de células malignas producidas por la infección con HPV. El Pap es una herramienta útil debido a su bajo costo y fácil realización; sin embargo, presenta serias deficiencias debido a que su sensibilidad y especificidad se ven afectadas por la experiencia del personal que toma y analiza la muestra [21, 22]. Los resultados obtenidos mediante citología se agrupan en 6 clasificaciones según el sistema *Bethesda* del año 1999 [4]. Estos grupos son; i) Negativo para lesiones intraepiteliales o malignidad; ii) ASCUS, referido a células escamosas atípicas de significancia indeterminada; iii) ASC-H, correspondiente a células escamosas atípicas que no pueden excluir lesiones de alto grado; iv) Lesión Intraepitelial de Bajo Grado o LIBG correspondiente a NIE I; v) Lesión Intraepitelial de alto grado o LIAG correspondiente a NIE II y NIE III y; vi) Carcinoma.

Una herramienta útil para complementar los resultados obtenidos por citología son las técnicas de biología molecular, las que están dirigidas a detectar la presencia del virus e identificar el genotipo infectante. Actualmente existe un gran número de técnicas de biología molecular utilizadas para el diagnóstico y genotipificación de HPV, como por ejemplo el test de Captura de Híbridos, capaz de detectar 13 genotipos de alto riesgo mediante la detección de híbridos RNA-DNA [23, 24]. Además, existen otros métodos de diagnóstico de HPV basados en la amplificación del genoma viral mediante PCR que presentan una gran variedad en su calidad analítica, y algunos con excelente sensibilidad y especificidad [25, 26].

El genotipo HPV-16 se encuentra en cerca del 21% de las lesiones de bajo grado y en el 50-60% de las lesiones de alto grado y cáncer invasor, seguido de HPV-18 que se ha determinado en el 10-15% de las lesiones NIE III [27, 28]. Aproximadamente el 50% de los casos diagnosticados por citología como ASCUS y el 80% de los diagnosticados como NIE I están infectados con HPV-AR. En los casos ASCUS, la presencia de DNA viral de HPV-AR es una información valiosa debido a que permite discriminar las



pacientes realmente infectadas con HPV de aquellas con ASCUS generados por otras causales, apoyando un eventual seguimiento clínico posterior. La presencia de DNA de HPV-AR en citología con resultado de NIE I no tiene utilidad pronóstica, porque en un gran porcentaje de neoplasias de bajo grado es factible determinar la presencia de genoma viral, lo que no necesariamente implica una evolución a lesiones de alto grado [27].

### **3. Biomarcadores de pronóstico de infección por HPV**

En la actualidad no se dispone de marcadores de pronóstico adecuados para monitorear el progreso de la infección viral *in vivo*. Existe un gran número de trabajos que proponen diferentes estrategias para pronosticar el desarrollo de la infección con HPV, pero hasta el momento no existe un consenso con respecto a cuál de todas las metodologías o marcadores biológicos son los más adecuados para un pronóstico certero. Algunos estudios han sugerido que la progresión de las lesiones causadas por HPV puede ser afectada por la carga viral de HPV. Xi y cols. [29] señalaron que la carga viral de las infecciones recién detectadas permitiría predecir la persistencia y la progresión de las infecciones causadas por HPV-16. Schmitt y cols. [30] sugirieron que la carga viral de HPV-AR podría ser más útil en la optimización de los estudios clínicos en las lesiones precursoras de cáncer, en comparación con aquellos métodos que analizan solamente la presencia o ausencia del DNA viral. Sin embargo, existen investigaciones que indican que la determinación de la carga viral se ve afectada por la toma de muestra realizada y que se necesitan mayores estudios para determinar un valor de corte para utilizarlo como un marcador predictivo [31]. Otros estudios han sugerido la utilidad de medir los RNAm de los oncogenes E6 y E7 como un eventual marcador de pronóstico [32, 33]. En consideración a los antecedentes planteados, en esta tesis se pretende evaluar la relación entre la carga viral de HPV y la progresión de la neoplasia en las células. Nuestra hipótesis de trabajo plantea que existe una correlación entre el aumento de la carga viral de HPV-16 cuantificada mediante la amplificación de segmentos de los genes L1 y E7 y la progresión de la neoplasia de las lesiones desde bajo hasta alto grado.



## **II. HIPÓTESIS**

En virtud de los antecedentes mencionados, se plantea la siguiente hipótesis:

*“Las pacientes infectadas con HPV-16 y con lesiones cervicales de alto grado presentan una mayor carga viral de HPV en comparación con aquellas infectadas y con lesiones de bajo grado”*

## **III. OBJETIVO GENERAL**

El objetivo general del proyecto es *“Determinar si existe una relación entre la carga viral de Virus Papiloma Humano mediante la amplificación de fragmentos de los genes L1 y E7 en pacientes infectadas con HPV-16 que presentan lesiones cervicales de alto y bajo grado”*.

## **IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Implementar el método de PCR en Tiempo Real para los genes L1 y E7 de HPV-16.
- 2- Cuantificar la carga de DNA viral mediante la amplificación de segmentos de los genes L1 y E7 en muestras cervicales de pacientes positivas para infección con HPV-16 que presentan lesiones de alto y bajo grado.
- 3- Evaluar la correlación entre los hallazgos moleculares y la información clínica-epidemiológica de las pacientes infectados con HPV-16.

## V. METODOLOGÍA

### 1- Muestras clínicas

Se evaluaron 387 muestras pertenecientes a pacientes mujeres que se encuentran insertas dentro del programa ginecológico del Hospital San Juan de Dios de Santiago, Región Metropolitana, Chile. Para la obtención de las muestras se utilizó tórula de algodón embebida en 2 ml de medio de transporte (1% Suero Fetal Bovino en PBS) y se realizó un raspado de la zona cérvico-vaginal. Las muestras fueron transportadas hasta la Sección Virus Oncogénicos del Instituto de Salud Pública de Chile en cajas con unidades refrigerantes para mantener temperatura, para posteriormente ser analizadas. El diagnóstico citológico se realizó de acuerdo a los protocolos rutinarios desarrollados en el establecimiento hospitalario. Del total de muestras, 292 presentaban alteraciones tales como: ASCUS, cervicopatías o no entregaban información citológica, por lo que fueron excluidas de la investigación. De las 95 muestras restantes: 35 resultaron positivas para otros HPV (excluidas de la investigación), 40 positivas para HPV-16, tanto como infecciones simples y como coinfección con otros HPV de alto y bajo riesgo, y 20 negativas para infección con HPV. Estos últimos dos grupos fueron incluidos en la investigación. Las 60 muestras seleccionadas fueron clasificadas en 3 grupos dependiendo de los resultados citológicos informados por el servicio de Ginecología y Obstetricia del hospital: NIE I, NIE II o NIE III (Figura 6).

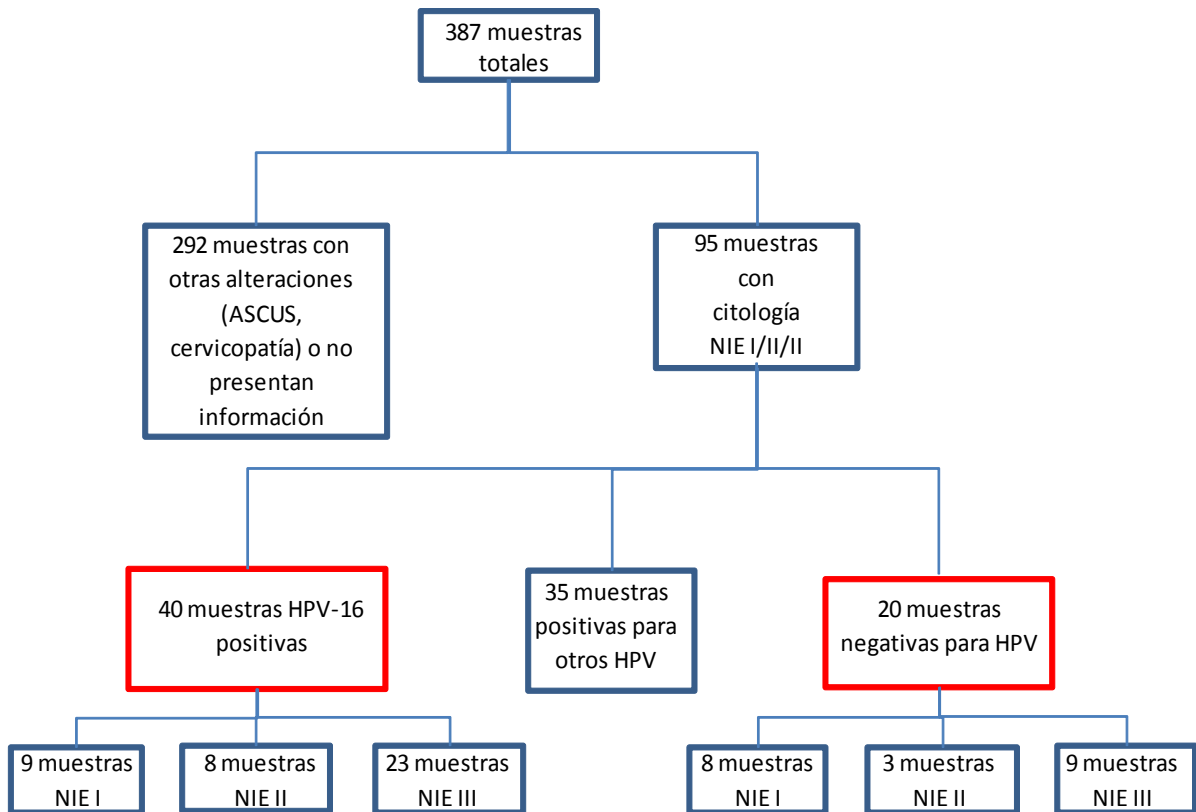


Figura 6: Diagrama de flujo para la selección de muestras. En rojo se destacan aquellas muestras que fueron seleccionadas para la investigación; 40 muestras positivas para HPV-16, de las cuales 9 son NIE I, 8 NIE II y 23 NIE III. Con respecto a las muestras negativas para HPV; 8 resultaron ser NIE I, 3 NIE II y 9 NIE III.

## 2- Líneas celulares

Como células control se utilizaron células SiHa infectadas con HPV-16 y células HeLa infectadas con HPV-18. La línea celular SiHa corresponde a células epiteliales derivadas de cérvix humano afectado de carcinoma escamoso grado II y que contienen integrado el genoma de HPV-16. Se estima que éstas presentan 2 copias de DNA de HPV-16 por célula [34]. La línea celular HeLa corresponde a células epiteliales obtenidas de cérvix humano afectado de adenocarcinoma y que contienen el genoma de HPV-18. Se estima que presentan 40 copias de DNA de HPV-18 por célula [34]. Además, se utilizaron como células control no infectadas con HPV las células K-562 que corresponden a linfoblastos de medula ósea afectados de leucemia.

### 3- **Extracción de DNA de líneas celulares y muestras clínicas**

La purificación de los ácidos nucleicos de las muestras clínicas y controles fue realizada mediante extracción automatizada en equipo NucliSens® EasyMag® (*BioMérieux*, catálogo 280140). El sistema se basó en las propiedades para lisar e inactivar nucleasas que presenta el agente caotrópico Tiocianato de Guanidina (GuSCN), junto con la propiedad de unir ácidos nucleicos que presenta la sílice en presencia de este agente [35]. Para el caso de los controles, se purificaron los ácidos nucleicos a partir de aproximadamente 3 a 5 millones de células. En el caso de las muestras, se empleó 1 ml de hisopado el cual se transfirió a 2 ml de tampón de lisis NucliSens® easyMag® *Extraction Lysis Buffer* (*BioMérieux*, catálogo 200292), que contenía Tiocianato de Guanidina y Triton X-100. Esto permitió la liberación de los ácidos nucleicos y la inactivación de las nucleasas presentes en la muestra. Luego, se agregó 50 µl de sílice magnética NucliSens® easyMag® *Magnetic Silica* (*BioMérieux*, catálogo 280133). La alta concentración de sales posibilita que los ácidos nucleicos se unan a las partículas magnéticas de óxido de sílice. El sistema magnético presente en el equipo atrae las partículas magnéticas de sílice, permitiendo que el sistema purifique el DNA mediante varios lavados con 3 soluciones tamponadas (Buffer 1 que contenía GuSCN, *BioMérieux*, catálogo 280130, Buffer 2, *BioMérieux*, catálogo 280131 y Buffer 3, *BioMérieux*, catálogo 280132). Posteriormente, los ácidos nucleicos fueron liberados de la sílice mediante el aumento de temperatura. Finalmente, los ácidos nucleicos en el eluido fueron separados de la sílice mediante el sistema magnético.

### 4- **Amplificación del DNA mediante PCR convencional:**

Con el fin de obtener controles positivos para ser utilizados en la amplificación por PCR en Tiempo Real, se realizó el clonamiento de fragmentos de los genes L1 y E7 de HPV-16 de células SiHa. La selección de estos genes se realizó para obtener información acerca de dos genes que se encuentran en diferentes posiciones en el genoma de HPV, con diferencia temporal en su expresión (tardía y temprana), que cumplen diferentes funciones en el ciclo infectivo viral y que además permitirían informar sobre la calidad o integridad del DNA viral.

Para tal propósito, inicialmente se implementaron las respectivas reacciones de PCR para cada gen en estudio. En relación a L1, gen que es el más conservado dentro del genoma viral, se utilizaron los partidores consenso Gp5+ y Gp6+ [36] (Tabla 1), que amplifican un gran espectro de genotipos de HPV y con los cuales se obtiene un producto de amplificación de aproximadamente 142 pb de longitud. Con respecto al gen E7, se utilizaron partidores tipo específicos debido a que presenta gran variabilidad genética entre los diferentes genotipos virales. Para HPV-16 se utilizó los siguientes partidores: HPV-16 E7 Fw y HPV-16 E7 Rv [34], obteniéndose un amplicón de aproximadamente 83 pb (Tabla 1).

Nombre	Secuencia (5'-3')	Gen	Posición	Tamaño producto (pb)
Gp5+ Gp6+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	L1 (HPV-16 NC_001526)	6625-6647 6742-6766	142
HPV-16 E7 Fw HPV-16 E7 Rv	CCGGACAGAGCCCATTACAAT ACGTGTGTGCTTTGTACGCAC	E7 (NC_001526)	700-720 762-782	83
$\beta$ -globin Fw $\beta$ -globin Rv	GACAGGTACGGCTGTCATCA TAGATGGCTCTGCCCTGACT	$\beta$ -globina (NC_000011.10)	5227186-5227205 5227078-5227097	128
P16 Gp6+	CATTATGTGCTGCCATATC GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC	L1 (HPV-16 NC_001526)	6665-6683 6742-6766	102

Tabla 1: Partidores utilizados en las diferentes reacciones de PCR: Listado de características de partidores utilizados para la amplificación tanto en PCR convencional como en PCR en tiempo real.

Todas las reacciones de PCR convencional se realizaron en un volumen final de 50  $\mu$ l, donde la concentración final de los reactivos fue: 1X de tampón de reacción (*Invitrogen*, 10966-030), 3,5 mM de solución de  $MgCl_2$  (*Invitrogen*, 10966-030), 200  $\mu$ M de solución mix dNTPs (*Omega Bio-Tek*, TQAC135), 0,8  $\mu$ M de cada partidor, 2,5 unidades de *Taq* polimerasa (*Invitrogen*, 10966-030) y se llevó a un volumen final de 45  $\mu$ l con agua libre de nucleasas (*Winkler*, BM-0140). Cada reacción de amplificación se realizó con 5  $\mu$ l de DNA templado. El equipo utilizado para realizar las reacciones de PCR convencional correspondió al termociclador marca *Eppendorf* modelo *Mastercycler® Personal*. Los diferentes perfiles térmicos se muestran en la Tabla 2:

Programa	Denaturación inicial	Etapa de ciclo			N° de ciclos	Extensión final
		Denaturación	Apereamiento	Extensión		
PCR gen E7	94°C 2 minutos	94°C 30 segundos	55°C 30 segundos	72°C 1 minuto	40	71°C 7 minutos
PCR gen L1	94°C 4 minutos	94°C 20 segundos	52°C 30 segundos	71°C 1 minuto 30 segundos	40	71°C 4 minutos

Tabla 2: Programas térmicos utilizados en la amplificación de PCR convencional. Listado de perfiles térmicos utilizados para la amplificación de los genes L1 y E7.

#### 5- Electroforesis en gel de agarosa

Para visualizar los resultados obtenidos mediante PCR convencional se realizó electroforesis en gel de agarosa (*Bioline*, BIO-41026) 1,5% en tampón TBE 1X. En el gel se cargaron 5 µl de muestra, 1 µl de tampón de carga (*Fermentas*, R0611) y 1 µl de GelRed 1:100 (*Biotium*, 41002). La electroforesis fue realizada durante 45 minutos a 100 Volts (*CBS Scientific*, WMGE-600; *Biorad*, Power Pac HV). Los resultados fueron visualizados en un transiluminador de luz UV y fotografiados (*UltraViolet Products*, Digi Doc-it System). Se utilizó un estándar de peso molecular de 100 pb (*Promega*, G210A).

#### 6- Clonamiento de fragmentos de genes L1 y E7

Para realizar el clonamiento de los fragmentos obtenidos mediante PCR se utilizó el kit *TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing* (*Invitrogen*, catálogo K4575), que utiliza como vector el plasmidio pCR® 4-TOPO (Anexo 1). Éste corresponde a un vector altamente eficiente, capaz de insertar directamente los productos amplificados mediante *Taq* polimerasa sin la necesidad de utilizar ligasa o realizar procedimientos post-PCR. Lo anterior se produce porque la enzima *Taq* polimerasa presenta actividad de transferasa no dependiente del templado, agregando una *Adenosina* (A) en el extremo 3' del producto PCR. El vector se encuentra linealizado y presenta en sus extremos 3' una *Timidina* (T). Esto permite que el producto de PCR se ligue eficientemente con el vector. La reacción de ligación es mediada por la enzima *Topoisomerasa I* [37].

El vector utilizado permite seleccionar directamente las colonias recombinantes debido a que el plasmidio contiene el gen letal *ccdB*. Éste codifica una proteína capaz de unirse de forma covalente a la DNA girasa (*Topoisomerasa II*) e interferir con su actividad. Esta unión entre la proteína CcdB y la DNA girasa promueve la degradación tanto del DNA plasmidial como del cromosómico [38]. El gen *ccdB* se encuentra fusionado en el C-terminal con una porción del gen *lacZα*. La ligación del producto de PCR interrumpe la expresión del gen *lacZα-ccdB*, permitiendo el crecimiento sólo de aquellas recombinantes que presentan el inserto.

La reacción de ligación se llevó a cabo de acuerdo a las instrucciones del fabricante (*Invitrogen K4575*), con ciertas modificaciones. Se utilizó 4 µl de producto PCR, 1 µl de solución salina y 1 µl de vector. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, para luego mantenerla en hielo hasta utilizarla en la transformación de las células competentes.

Para la transformación se utilizaron las células químicamente competentes *Escherichia coli One Shot® TOP10* (*Invitrogen, C4040*). La reacción se llevó a cabo de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Se agregó 5 µl del producto ligado a 50 µl de células, mezcla que se incubó durante 30 minutos en hielo. Luego, se realizó un shock térmico a 42°C en baño termorregulado (*Memmert, WB-10*) durante 30 segundos. Rápidamente los tubos se pusieron en hielo durante 2 minutos. Posteriormente, se agregó 250 µl de medio SOC (*Invitrogen, 15544-034*) y se incubó en horno (*Memmert, IF55*) aproximadamente durante 1 hora a 37°C en forma horizontal y con agitación. Luego de transcurrido el período de incubación, se esparció 30 µl de la mezcla en una placa que contenía agar LB que presentaba una concentración de 75 µg/ml de ampicilina. Las placas fueron incubadas a 37°C durante la noche.

Se seleccionaron 4 a 8 colonias por gen en estudio, las que fueron cultivadas en 5 ml de medio LB con 75 µg/ml de ampicilina a 37°C durante la noche. El número de colonias seleccionadas es el recomendado por el fabricante.

Los plasmidios recombinantes se purificaron mediante el kit de miniprep QIAprep® (*Qiagen, 27104*), los que posteriormente fueron utilizados como control positivo en la amplificación por PCR en Tiempo Real y para la generación de las respectivas curvas estándar. Los insertos fueron verificados mediante digestión con enzima de restricción *EcoRI*.

7- **Detección y genotipificación de HPV en muestras clínicas de pacientes**

Las muestras fueron genotipificadas mediante la técnica de Hibridación Reversa en Línea (RLB, por sus siglas en inglés *Reverse Line Blot*). Esta técnica se basa en la amplificación por PCR convencional utilizando un conjunto de 18 partidores genéricamente llamados PGMY-11 y PGMY-09 [39]. Éstos permiten detectar un gran espectro de genotipos virales generando un amplicón de aproximadamente 450 pb. La particularidad de este PCR es que el conjunto de 5 partidores *Forward* PGMY 11 se encuentran marcados con Biotina en el extremo 5', lo que produce un amplicón biotinilado. El producto de la amplificación obtenido se desnaturó e hibridó a una membrana de nylon en la cual estaban fijadas covalentemente oligosondas HPV tipo específicas. Las sondas tipo específicas son oligonucleótidos que en su extremo 5' presentan un grupo amino, el cual forma un enlace covalente con la membrana que fue activada con EDAC (1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida-HCl), agente químico capaz de activar grupos carboxilos para la formación de amidas. El producto hibridado se incubó con un conjugado Avidina-Peroxidasa que permitió detectar la quimioluminiscencia en un film autoradiográfico. La técnica se realizó en un sistema de "miniblotter" (*Immunetics*, modelo M45) que permitió la detección de 31 genotipos de HPV [39]. Además, se utilizó una pareja de partidores para amplificar un fragmento del gen que codifica el Antígeno Leucocitario de Humano (HLA, por sus siglas en inglés *Human Leukocyte Antigen*) usado como control interno celular, que generan un amplicón de aproximadamente 230 pb. Este control permitió verificar la existencia de cantidad suficiente de DNA y la ausencia de inhibidores en la muestra que afectasen la amplificación.

La reacción de PCR previa a la hibridación se realizó en un volumen final de 50 µl, donde la concentración final de los reactivos fue: 1X de tampón de reacción (*Invitrogen*, 10966-030), 3mM de solución de MgCl<sub>2</sub> (*Invitrogen*, 10966-030), 200 µM de solución mix dNTPs (*Omega Bio-Tek*, TAQC135), 80 nM de cada partidor, 1,25 U/µl de *Taq* polimerasa (*Invitrogen*, 10966-030) y se llevó a un volumen final de 45 µl con agua libre de nucleasas (*Winkler*, BM0140). Cada reacción de amplificación se realizó con 5 µl de DNA templado. El perfil térmico utilizado fue: 95°C 9 min. / 95°C 3 seg.; 55°C 90 seg.; 72°C 2 min (45 ciclos) / 72°C 5 min. El equipo utilizado para realizar las



reacciones de PCR convencional correspondió al termociclador marca *Eppendorf* modelo *Mastercycler® Personal*.

8- **Cuantificación de la carga viral de HPV mediante PCR en tiempo real**

Se cuantificó mediante PCR en Tiempo Real los genes L1 y E7. Para esto se utilizaron como controles los productos del clonamiento. Se realizaron curvas de calibración con los productos clonados. A partir de estos resultados se cuantificaron los genes en estudio en las muestras problema. Como control de amplificación e integridad de DNA se utilizó la amplificación de un fragmento del gen HBB, que codifica para la proteína  $\beta$ -Globina humana. Para los tres genes (L1, E7 y  $\beta$ -Globina) se utilizó como método de detección de la amplificación la fluorescencia emitida por *SyBrGreen* (Tabla 1).

Todas las reacciones de PCR se realizaron en un volumen final de 20  $\mu$ l y las concentraciones finales de los reactivos fueron: 1X Q-PCR *Master Mix* (*Agilent Technologies*, 600828), 0,5  $\mu$ M de cada partidor y se llevó a un volumen final de 16  $\mu$ l con agua libre de nucleasas (*Winkler*, BM-0140). Todas las reacciones se realizaron con 4  $\mu$ l de DNA. El equipo utilizado correspondió a un termociclador marca *Agilent Technologies* modelo Mx3005P (Programa computacional *MxPro QPCR Software* 4.10). Los diferentes perfiles térmicos utilizados se muestran en la Tabla 3.

Programa	Hot Start	Etapa de ciclo			N° de ciclos	Curva de disociación
		Denaturación	Apareamiento	Extensión		
Gen L1	95°C 10 minutos	95°C 10 segundos	55°C 20 segundos	72°C 30 segundos	45	95°C-10 seg, 25°C-5 seg, 68°C-15 seg, 95°C-1 seg
Gen E7	95°C 10 minutos	95°C 20 segundos	60°C	1 minuto	45	95°C-10 seg, 25°C-5 seg, 68°C-15 seg, 95°C-1 seg

Tabla 3: Programas térmicos utilizados en la amplificación de PCR tiempo real. Características de los perfiles térmicos utilizados para la amplificación de los genes E7 y L1.

Para confeccionar las curvas de calibración se realizaron 10 diluciones seriadas con factor de 10. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Las

curvas fueron construidas graficando los valores  $C_T$  v/s Log  $n^\circ$  de copias. La curva estándar se obtuvo mediante regresión lineal de los puntos obtenidos.

Las concentraciones de DNA fueron cuantificadas en triplicado en espectrofotómetro *Genova Nano* de *Jenway*.

Para el análisis de las muestras clínicas en estudio, se midió inicialmente la concentración de DNA de cada una de ellas mediante espectrofotómetro. Con el fin de homogenizar la cuantificación de la carga viral de las muestras, todas fueron evaluadas en una concentración inicial de 10 ng/ $\mu$ l. Todas las muestras fueron analizadas para los genes L1, E7 y  $\beta$ -Globina. Todas las muestras debían ser positivas para la amplificación del segmento del gen que codifica la  $\beta$ -Globina para ingresar al estudio.

El cálculo del número de copias de los genes se realizó mediante interpolaciones en las respectivas curvas de calibración.

El cálculo de la carga viral se realizó con la razón entre el número de copias del gen viral versus el número de copias de  $\beta$ -Globina [40].

#### 9- **Análisis estadístico**

La carga viral fue determinada mediante el cálculo de la razón entre el número de copias de cada gen viral (L1 y E7) y el número de copias de un fragmento del gen que codifica la  $\beta$ -Globina humana. El número de copias de los genes en estudio se calculó mediante la curva de calibración realizada para cada gen. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Para correlacionar los resultados de los genes en las diferentes lesiones cervicales se utilizó el test de *Kruskal-Wallis*. Se comparó los valores de las medianas entre todos los grupos. Valores “P” inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Para comparar los resultados de cargas virales de dos grupos por separado, se empleó el test de *Mann Whitney* considerando los valores de  $P < 0,05$  como estadísticamente significativos. En los estudios de correlación de los genes L1 y E7 se empleó el test de *Spearman*, donde valores entre 0 y 1 indican correlación positiva; valores cercanos a 0 muestran que no hay relación lineal entre ambos grupos. Valores “P” inferiores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. El programa estadístico utilizado para realizar todos los análisis fue *GraphPad versión 6.0*.

## VI. RESULTADOS

### 1. Pacientes

Se trabajó con muestras de 60 pacientes diagnosticadas con lesiones NIE I/II/III: 40 resultaron positivas para HPV-16 y 20 negativas para la infección con HPV. Todas las muestras resultaron positivas para la amplificación del fragmento del gen HBB utilizado como control de integridad de la muestra. El promedio de edad de las pacientes fue  $34,6 \pm 8,1$  años. Cuando se realizó un análisis de la distribución de los rangos etarios, tanto en los casos positivos para HPV-16 como negativos para la infección, se observó que en el primer grupo el mayor número de casos se encuentra en el rango etario 30-39 años. En cambio, los casos negativos se distribuyen de forma homogénea entre las diferentes edades. Del total de casos positivos para la infección con HPV-16, el 38,3% resultó ser infección simple y un 28,3% una infección múltiple, donde se pueden encontrar HPV de alto y bajo riesgo. En la Tabla 4 se muestra un cuadro resumen de las características epidemiológicas de las pacientes.

	Positivos HPV-16	Negativos HPV	TOTAL
Variable	N° de casos (%)	N° de casos (%)	N° de casos (%)
<b>Cantidad de muestras</b>	40 (66,7)	20 (33,3)	60 (100)
<b>Edad (años)</b>			
20-29	11 (18,3)	6 (10)	17 (28,3)
30-39	21 (35)	7 (11,7)	28 (46,7)
40-49	6 (10)	6 (10)	12 (20)
50-59	2 (3,3)	1 (1,7)	3 (5)
<b>Colposcopia</b>			
Positiva	30 (50)	9 (15)	39 (65)
Negativa	1 (1,7)	1 (1,7)	2 (3,3)
S/I	9 (15)	10 (16,7)	19 (31,7)
<b>Citología</b>			
NIE I	9 (15)	8 (13,3)	17 (28,3)
NIE II	8 (13,3)	3 (5)	11 (18,3)
NIE III	23 (38,3)	9 (15)	32 (53,3)
<b>Infección HPV</b>			
Única	23 (38,3)	N/A	23 (38,3)
Múltiple	17 (28,3)	N/A	17 (28,3)
Negativo	N/A	20 (33,3)	20 (33,3)

Tabla 4: Características epidemiológicas de las 60 pacientes evaluadas.

N/A: No Aplica.

S/I: Sin Información.

## 2. Clonamiento en vector plasmídico de los amplicones de los genes L1 y E7 de HPV-16

Para realizar el clonamiento de los fragmentos de los genes L1 y E7, se estandarizaron las respectivas reacciones de PCR convencionales. Con respecto al gen L1, para el que se utilizaron partidores consenso que amplifican un gran espectro de genotipos virales, se obtuvo una banda única que coincide con el tamaño teórico de aproximadamente 142 pb. (Figura 7A). En tanto para el gen E7 se utilizaron partidores tipo específicos para HPV-16 y se obtuvo una banda única que coincide con el tamaño teórico de aproximadamente 83 pb (Figura 7B).

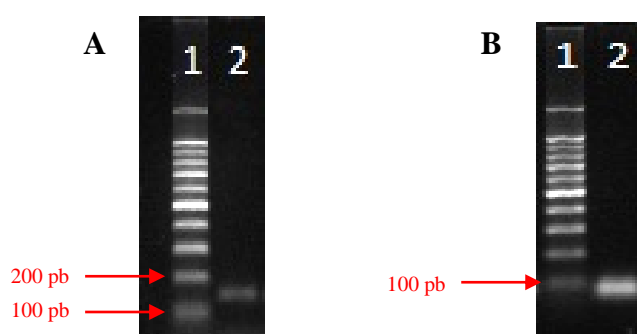


Figura 7: Electroforesis en gel de agarosa de amplicones de genes L1 y E7. Figura 7A: Electroforesis de productos de PCR de gen L1 de HPV-16 con partidores Gp5+/Gp6+. En el carril 2 se observa la amplificación de HPV-16 del tamaño teórico esperado que corresponde a aproximadamente 142 pb. Carril 1 estándar de peso molecular de 100 pb. Gel de agarosa 1.5% teñido con GelRed. Figura 7B: Electroforesis de productos de PCR de gen E7 de HPV-16. En el carril 2 se observa la banda del tamaño teórico esperado con los partidores HPV-16 E7 Fw/Rv. En el carril 1 estándar de peso molecular 100 pb. Gel de agarosa 1.5% teñido con GelRed.

Los fragmentos obtenidos fueron clonados en el vector plasmídico *pCR™ 4-TOPO®*. Como resultado, se obtuvo aproximadamente 40 a 100 unidades formadoras de colonias (ufc) por placa. Según indica el fabricante, la fórmula para calcular el rendimiento del clonamiento es la siguiente (Adaptado de *Invitrogen*, C4040):

$$\text{Eficiencia de la transformación} = \frac{\text{N}^\circ \text{ colonias}}{\text{pg } pCR\text{-4 } TOPO} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{\mu\text{g}} \times \frac{\mu\text{l volumen total}}{\mu\text{l plaqueados}} \times \text{factor de dilución}$$

(N° transformantes/ $\mu\text{g}$  DNA)

La eficiencia de la transformación de células químicamente competentes debiese ser cercana a  $1 \times 10^9$  ufc/ $\mu\text{g}$  DNA. En este caso, se utilizó 10 pg de DNA plasmidial, 300  $\mu\text{l}$  de volumen total, de los cuales se plaquearon 30  $\mu\text{l}$  y factor de dilución 1. Como resultado, se obtuvo una eficiencia entre  $4 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  ufc/ $\mu\text{g}$  de DNA, lo que es

levemente inferior a lo esperado. Esto se debería a que el inserto cercano a 80 pb es pequeño, por lo que en algunos casos no sería capaz de interferir con la expresión del gen *ccdB* y la bacteria sería incapaz de sobrevivir.

### **3. Implementación del método de PCR en tiempo real para la amplificación de fragmentos de los genes E7 y L1 de HPV-16**

La implementación y estandarización de las diferentes reacciones de PCR se llevó a cabo con los productos obtenidos del clonamiento de los fragmentos de los genes L1 y E7. En cada caso, se realizó una serie de experimentos para probar tanto la calidad de los plasmidios recombinados, como de las condiciones ideales para obtener la curva de calibración para ambos genes.

- a) Implementación de un PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen E7. En primer lugar, para la estandarización de la reacción de PCR se analizó la amplificación de los partidores específicos para HPV-16 utilizando como control positivo de amplificación las células SiHa que están infectadas con HPV-16. Como controles de especificidad se utilizaron células HeLa infectadas con HPV-18 y células K-562 no infectadas con HPV. Como control de contaminación se utilizó agua libre de nucleasas. Los partidores fueron analizados a diferentes temperaturas de apareamiento hasta obtener curvas con la mejor cinética de amplificación. El perfil térmico que mejor se ajustó al resultado esperado correspondió a una temperatura de apareamiento de los partidores de 60°C.

Bajo las condiciones descritas se obtuvieron amplificaciones específicas. Es decir, no hubo amplificación con DNA de células HeLa, células K-562 o a partir de agua (Figura 8).

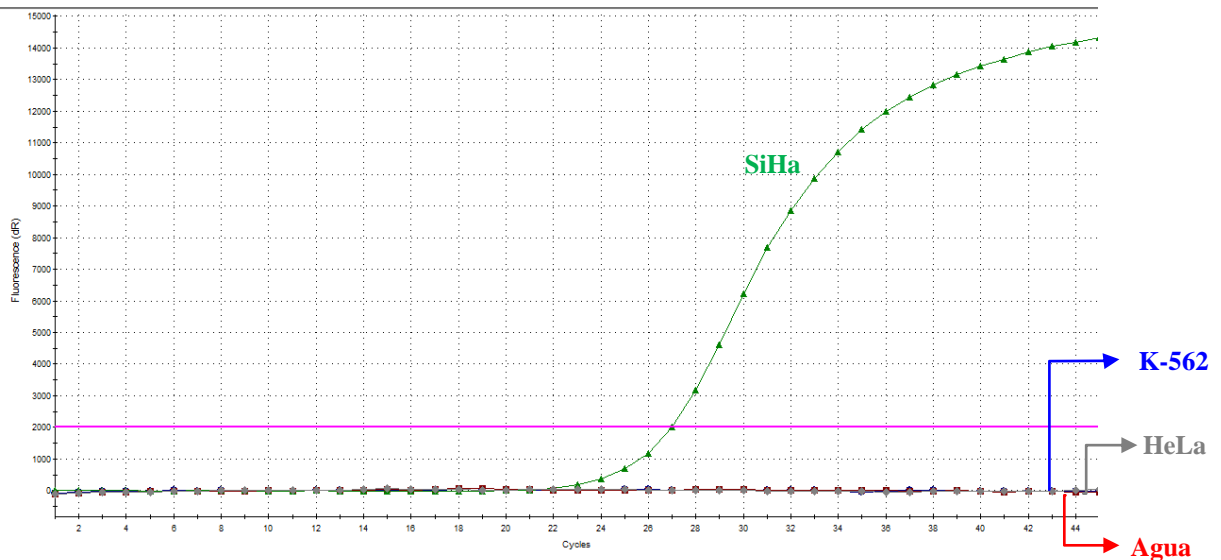


Figura 8: Implementación de un PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen E7. Se observa la curva de amplificación (verde) generada al amplificar DNA obtenido desde células SiHa con los partidores HPV-16 E7 Fw/Rv, con los cuales se obtuvo un  $C_T$  cercano a 26. No se detectó amplificación cruzada con células HeLa (gris) o K-562 (azul). Tampoco se detectó amplificación inespecífica a partir de agua (rojo).

Para demostrar que el producto obtenido correspondía al esperado, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% teñido con GelRed, obteniéndose una sola banda de amplificación que corresponde aproximadamente al número de pares de bases esperado. Como resultado de la amplificación se obtuvo un sólo producto de amplificación, representado por un sólo pico en la temperatura de disociación esperada y ausencia de amplificaciones inespecíficas. Además, se realizó el cálculo de la temperatura de disociación (TM) teórica de los amplicones para corroborar que dichos picos correspondían al amplicón esperado. Para esto se utilizó el programa en línea de la *Universidad de Northwestern, Illinois, EUA* (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>). En el caso del producto amplificado a partir de células SiHa, se obtuvo un pico con una TM de 79,6°C y una TM teórica de 77,5°C (Figura 9).

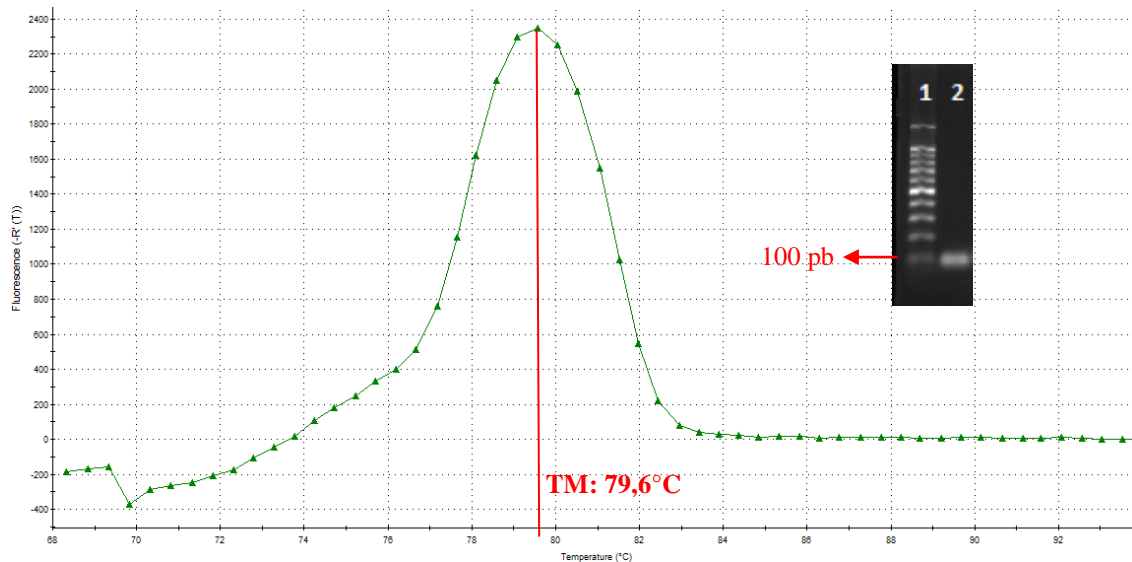


Figura 9: Curva de disociación obtenida al amplificar un fragmento del gen E7 de HPV-16 y electroforesis de producto de PCR a partir de DNA extraído de células SiHa. Representa la curva de disociación obtenida al amplificar DNA extraído de células SiHa (verde) con los partidores HPV-16 E7 Fw/Rv, donde se observa un único pico de 79,6°C. El recuadro muestra una electroforesis en geles de agarosa al 1,5 %, teñido con GelRed, donde se detectó un único producto de PCR similar al tamaño teórico de aproximadamente 83 pb (carril 2). Carril 1, estándar de peso molecular de 100 pb.

Bajo las condiciones descritas, se analizaron los plasmidios recombinantes obtenidos en el clonamiento. En el caso de HPV-16 se analizaron 7 plasmidios. En todos los casos analizados hubo amplificación. Se seleccionó una de las preparaciones de DNA plasmidial obtenidas y se cuantificó en triplicado su concentración mediante espectrofotómetro. El promedio de la concentración fue de 20,92 ng/μl. A partir de éste, se construyó la curva de calibración para el gen E7 de HPV-16.

Para realizar la curva de calibración se realizaron 10 diluciones seriadas con factor de 10. Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Las curvas fueron construidas graficando los valores  $C_T$  v/s  $\text{Log } n^\circ$  de copias. La curva estándar se obtuvo mediante regresión lineal de los puntos obtenidos (Tabla 5). Para determinar el número de copias del plasmidio se utilizó la siguiente fórmula (adaptada de [41]):

$$\text{N}^\circ \text{ de copias} = \frac{6,02 \times 10^{23} (\text{copias/mol}) \times [\text{DNA}] (\text{gr})}{\text{tamaño plasmidio (pb)} \times 660 (\text{g/mol/pb})}$$

En la Figura 10 se observa la curva de calibración realizada para el gen E7 de HPV-16, observándose un alto índice de correlación lineal ( $R^2 > 0,9$ ). La sensibilidad del método fue 90 copias de DNA plasmidial de HPV-16 en la dilución  $10^{-9}$ . En las diluciones mayores no se detectó amplificación. Tomando en cuenta que una célula SiHa posee en promedio 2 copias de DNA de HPV-16 [34], teóricamente 90 copias equivaldrían a 45 células.

Plasmidio E7 HPV-16				
Dilución	Concentración (ng/reacción)	$C_T$ (promedio)	Desviación estándar (+/-)	N° de copias
$10^{-1}$	40	8,57	0,34	$9,03 \times 10^9$
$10^{-2}$	4	10,85	0,08	$9,03 \times 10^8$
$10^{-3}$	$4 \times 10^{-1}$	14,20	0,25	$9,03 \times 10^7$
$10^{-4}$	$4 \times 10^{-2}$	17,33	0,13	$9,03 \times 10^6$
$10^{-5}$	$4 \times 10^{-3}$	20,57	0,14	$9,03 \times 10^5$
$10^{-6}$	$4 \times 10^{-4}$	24,05	0,42	$9,03 \times 10^4$
$10^{-7}$	$4 \times 10^{-5}$	26,62	0,70	$9,03 \times 10^3$
$10^{-8}$	$4 \times 10^{-6}$	29,87	0,11	$9,03 \times 10^2$
$10^{-9}$	$4 \times 10^{-7}$	33,87	0,32	$9,03 \times 10^1$

Tabla 5: Valores de  $C_T$  obtenidos al amplificar un fragmento del gen E7; de acuerdo a la concentración o número de copias del plasmidio con el inserto del gen E7 HPV-16.



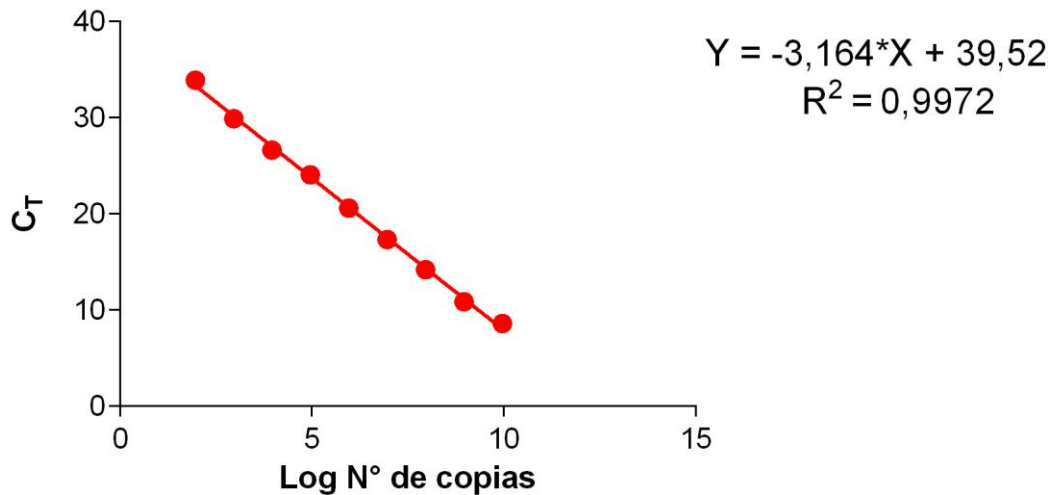


Figura 10: Curva de calibración del número de copias del plasmidio E7 de HPV-16 según el C<sub>T</sub>. Se grafica los C<sub>T</sub>s obtenidos experimentalmente a las diferentes diluciones v/s el Log del número de copias, calculado según la concentración de DNA. El índice de correlación lineal (R<sup>2</sup>) fue > 0,9. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Se graficaron las desviaciones estándar para cada punto, pero éstas no logran visualizarse en el gráfico.

- b) Implementación de un PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen L1. Al igual como se realizó con el gen E7, en primer lugar se probaron diferentes condiciones de amplificación para el gen L1 hasta obtener la curva de amplificación con la mejor cinética. Para esto, se utilizaron células SiHa (HPV-16) como control positivo de amplificación, utilizando partidor *forward* P16 [42] y el partidor *reverse* Gp6+, con los que se obtiene un producto de amplificación del tamaño teórico esperado de aproximadamente de 102 pb (Tabla 1). Además, se utilizaron los controles de especificidad con células HeLa, K-562 y agua. En ninguno de estos tres controles se detectó amplificación (Figura 11).

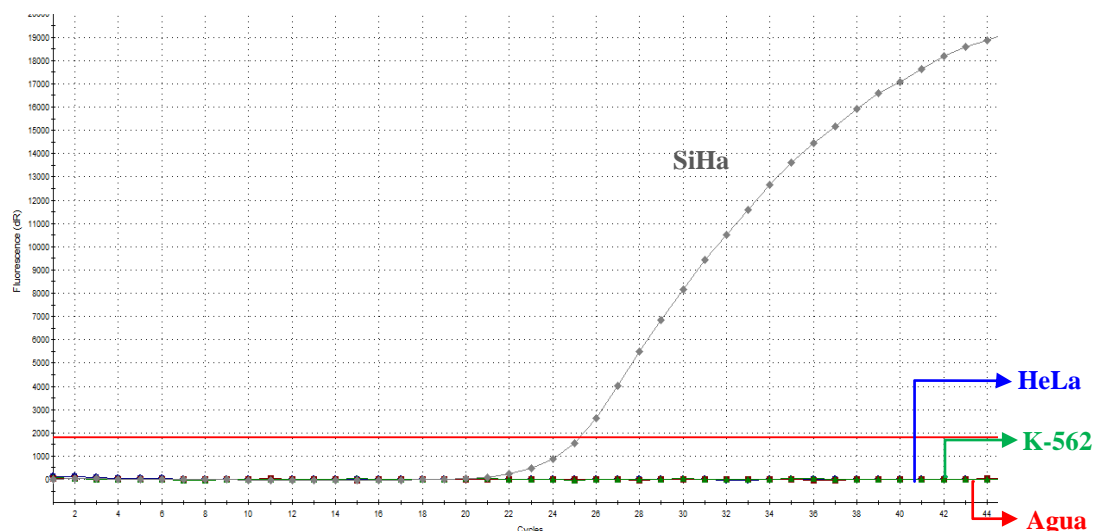


Figura 11: Implementación de un PCR en tiempo real para la amplificación de un fragmento del gen L1 de HPV-16. Se observa la curva de amplificación (gris) obtenida al amplificar DNA obtenido desde células SiHa con los partidores P16/Gp6+, con los cuales se obtiene un  $C_T$  cercano a 25. Además se puede observar que no existe amplificación cruzada con HeLa (azul) y K-562 (verde) y tampoco existe amplificación inespecífica con agua (rojo).

Como resultado de la estandarización del PCR, se obtuvo un sólo producto de amplificación representado por un sólo pico y ausencia de amplificaciones inespecíficas. Para corroborar que el producto obtenido correspondía al esperado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose una sola banda de amplificación correspondiente al tamaño esperado. Además, al igual como se realizó con el gen E7, se calculó la temperatura de disociación (TM) teórica del amplicón para verificar que el pico obtenido en la amplificación correspondía al esperado. La TM teórica de  $73,6^{\circ}\text{C}$  y la temperatura experimental resultó ser de  $73,8^{\circ}\text{C}$  (Figura 12).

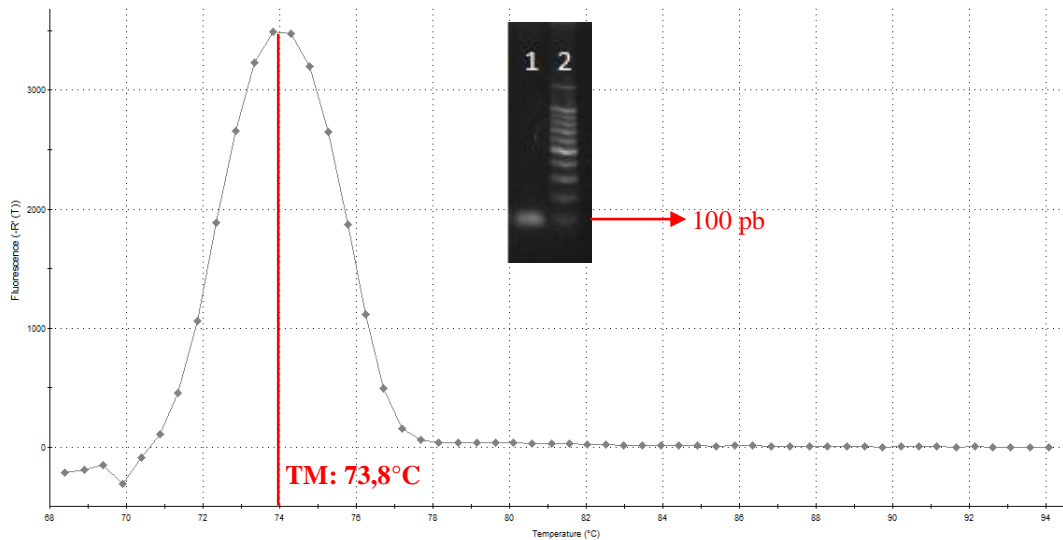


Figura 12: Curva de disociación obtenida al amplificar un fragmento del gen L1 de HPV-16 y electroforesis de producto de PCR a partir de DNA extraído de células SiHa. Representa la curva de disociación obtenida al amplificar DNA obtenido desde células SiHa (gris) con los partidores P16/Gp6+, donde se observa un único pico de 73,8°C. El recuadro muestra una electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñido con GelRed, donde se detectó un único producto de PCR que presenta un tamaño teórico esperado de aproximadamente 102 pb (carril 1). Carril 2, estándar de peso molecular de 100 pb.

Para construir las curvas de de calibración se seleccionó una preparación de DNA plasmidial recombinante, a la cual se le cuantificó en triplicado la concentración mediante espectrofotómetro. El promedio de la concentración para el plasmidio recombinante para L1 de HPV-16 fue de 102,8 ng/μl. Al igual como se realizó para el gen E7, se construyó una curva de calibración a partir de diluciones seriadas en factor de 10 de la preparación plasmidial seleccionada, desde una dilución  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ . Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Las curvas fueron realizadas graficando los valores  $C_T$  de cada dilución v/s Log n° de copias. La curva estándar se obtuvo mediante regresión lineal de los puntos obtenidos. Para realizar el cálculo del número de copias, se utilizó la misma fórmula utilizada para el gen E7 [41] (Tabla 6).

En la Figura 13 se observa la curva de calibración obtenida para el gen L1 de HPV-16, observándose un alto índice de correlación lineal ( $R^2 > 0.9$ ). Al determinar el límite de detección del número de copias de DNA para el gen L1 de HPV-16 se obtuvo 924 copias de DNA para la dilución  $10^{-8}$ . Tomando en cuenta que en una célula SiHa se encuentran 2 copias de DNA de HPV-16 [34], teóricamente 924 copias corresponderían a 462 células.

Plasmidio L1 HPV-16				
Dilución	Concentración (ng/reacción)	C <sub>T</sub> (promedio)	Desviación estándar (+/-)	N° de copias
10 <sup>-1</sup>	41,12	7,14	0,02	9,24x10 <sup>9</sup>
10 <sup>-2</sup>	4,112	9,82	0,05	9,24x10 <sup>8</sup>
10 <sup>-3</sup>	4,11x10 <sup>-1</sup>	14,52	0,15	9,24x10 <sup>7</sup>
10 <sup>-4</sup>	4,11x10 <sup>-2</sup>	18,55	0,20	9,24x10 <sup>6</sup>
10 <sup>-5</sup>	4,11x10 <sup>-3</sup>	22,63	0,15	9,24x10 <sup>5</sup>
10 <sup>-6</sup>	4,11x10 <sup>-4</sup>	26,02	0,09	9,24x10 <sup>4</sup>
10 <sup>-7</sup>	4,11x10 <sup>-5</sup>	30,40	0,31	9,24x10 <sup>3</sup>
10 <sup>-8</sup>	4,11x10 <sup>-6</sup>	34,01	1,53	9,24x10 <sup>2</sup>

Tabla 6: Valores de C<sub>T</sub> obtenidos al amplificar un fragmento del gen L1, de acuerdo a la concentración o número de copias del plasmidio con el inserto del L1 HPV-16.

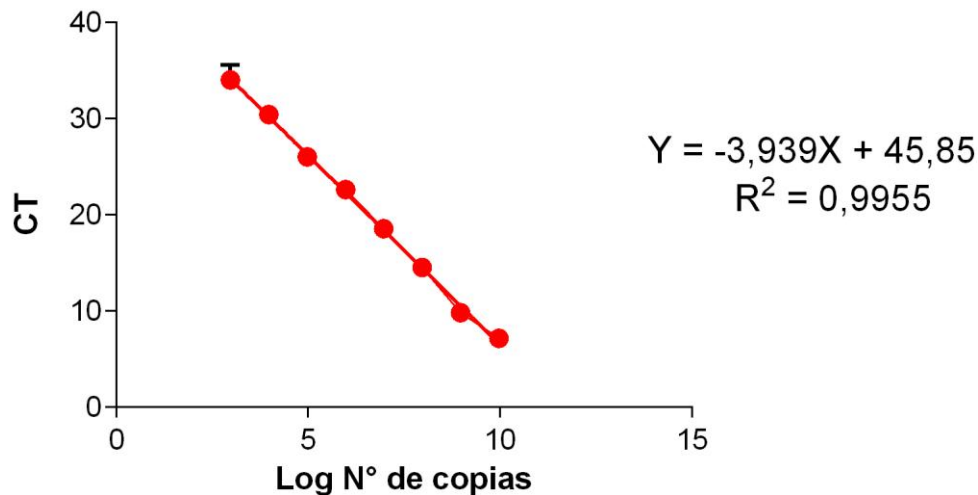


Figura 13: Curva de calibración obtenida con el plasmidio L1 de HPV-16. Se grafica los C<sub>T</sub>s obtenidos a las diferentes diluciones v/s el Log del número de copias calculado según la concentración de DNA. El índice de correlación lineal (R<sup>2</sup>) fue > 0,9. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Se graficaron las desviaciones estándar para cada punto, las que sólo se logran visualizar en uno de los puntos (negro).

- c) Implementación de un PCR en tiempo real para amplificar un fragmento del gen HBB. Como control de integridad de DNA y de amplificación se utilizó el gen que codifica la proteína β-Globina humana. La detección de un amplicón de este gen indicó que: el DNA se encontraba íntegro, existía una cantidad

suficiente de templado y la ausencia de inhibidores de la reacción de PCR. Para tal propósito, se utilizó una pareja de partidores  $\beta$ -globin *forward/reverse* que producían un amplicón de 128 pb [34]. Estos partidores fueron ensayados tanto a 55°C como a 60°C, temperaturas de apareamiento de los PCR de los genes L1 y E7, respectivamente. En la Figura 14 se observa la curva de amplificación del gen HBB para ambas temperaturas. Como control de amplificación se utilizó agua libre de nucleasas.

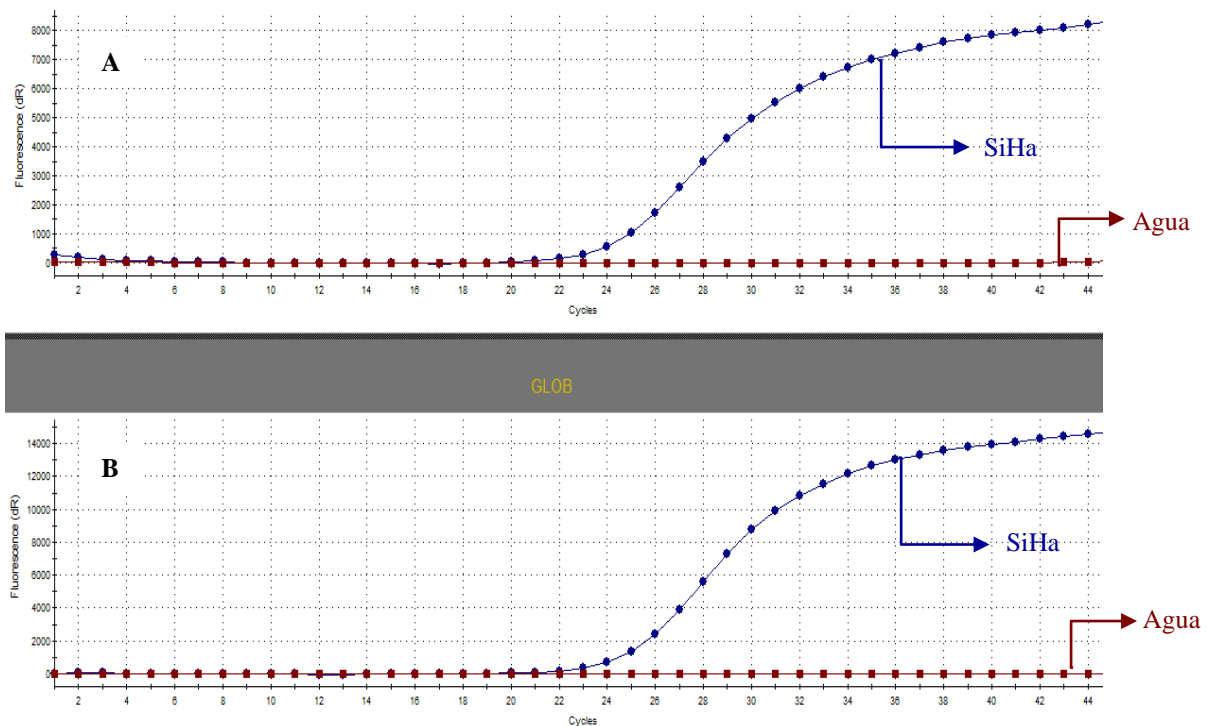


Figura 14: Curvas de amplificación obtenidas al amplificar un fragmento del gen HBB a 55°C y 60°C. (A) Curva de amplificación (azul) a 55°C, obtenida al amplificar DNA obtenido desde células SiHa con los partidores  $\beta$ -globin Fw/Rv, con los cuales se obtuvo un  $C_T$  cercano a 22. (B) Curva de amplificación (azul) a 60°C, obtenida al amplificar DNA obtenido desde células SiHa con los partidores  $\beta$ -globin Fw/Rv, con los cuales se obtuvo un  $C_T$  cercano a 23. En ambas temperaturas no se detectó amplificación inespecífica a partir de agua (rojo).

Como resultado de la amplificación, tanto a 55°C como a 60°C se obtuvo un sólo producto de amplificación representado por un sólo pico y ausencia de amplificaciones inespecíficas. Para corroborar que el producto obtenido correspondía al esperado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa, obteniéndose una sola banda de amplificación correspondiente al valor teórico esperado de aproximadamente 128 pb. Además, al igual como se realizó con los

otros genes en estudio, se calculó la temperatura de disociación (TM) teórica del amplicón para corroborar que el pico obtenido en la amplificación correspondía al esperado. La TM teórica es de 84°C y la temperatura experimental resultó ser de 85,3°C cuando se utilizó una temperatura de apareamiento de 55°C y de 85,7°C cuando se utilizó una temperatura de apareamiento de 60°C (Figura 15).

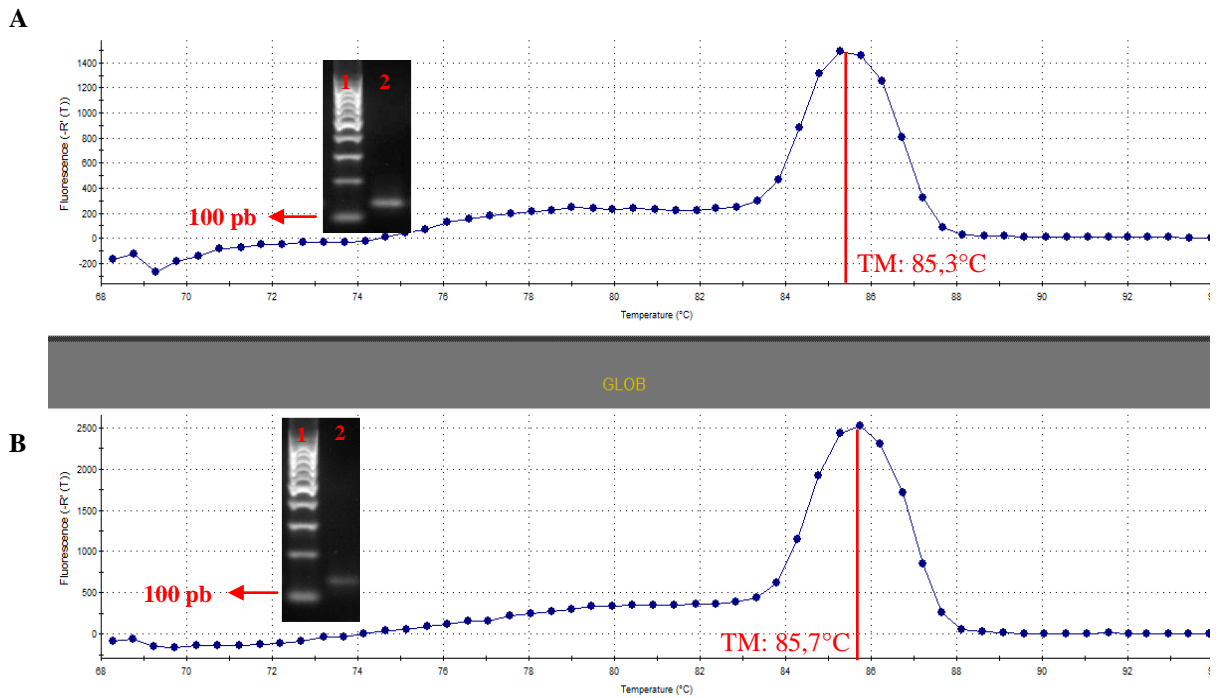


Figura 15: Curvas de disociación obtenidas al amplificar un fragmento del gen HBB. (A) Curva de disociación obtenida con la temperatura de apareamiento 55°C al amplificar DNA obtenido desde células SiHa (azul) con los partidores  $\beta$ -globin Fw/Rv, donde se observa un único pico de 85,3°C. (B) Curva de disociación obtenida con la temperatura de apareamiento 60°C al amplificar DNA obtenido desde células SiHa (azul) con los partidores  $\beta$ -globin Fw/Rv, donde se observa un único pico de 85,7°C. En los recuadros se observa la electroforesis en gel de agarosa 1,5% teñido con GelRed. Carril 1, estándar de peso molecular de 100 pb.

Para construir las curvas de calibración para la amplificación de un fragmento del gen HBB a 55°C y 60°C, se utilizó células SiHa que son positivas para HPV-16, a las cuales se cuantificó en triplicado la concentración de DNA mediante espectrofotómetro. Para ambos análisis se trabajó con una concentración inicial de 20 ng por reacción. La curva se construyó a partir de diluciones seriadas en factor de 10, desde una dilución  $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ . Además, se realizó una amplificación de la muestra sin dilución. Tanto para la temperatura 55°C como para 60°C, sólo se logró detectar amplificación hasta la dilución  $10^{-3}$ . Todos los ensayos fueron realizados en triplicado. Las curvas fueron

realizadas graficando los valores  $C_T$  de cada dilución v/s Log n° de copias. La curva estándar se obtuvo mediante regresión lineal de los puntos obtenidos. Para realizar el cálculo del número de copias se consideró que una célula posee aproximadamente 6 pg de DNA [43]. Así, se estimó el número inicial de células que representaba una determinada concentración de DNA, multiplicando por un factor de 2 por existir dos copias del gen por célula (Tabla 7).

En la Figura 16 se observan las curvas de calibración obtenida para el gen que codifica la  $\beta$ -Globina, tanto a 55°C como a 60°C, observándose un alto índice de correlación lineal ( $R^2 > 0.9$ ).

Al determinar el límite de detección del número de copias de DNA para el gen que codifica la  $\beta$ -Globina a 55°C se obtuvo 61,9 copias, lo que representaría aproximadamente 31 células. Con respecto al límite de detección del número de copias obtenido con la temperatura de apareamiento 60°C, se alcanzó como resultado 60,6 copias, lo que corresponde aproximadamente a 30 células. Por lo tanto, en ambos ensayos se obtiene un límite de detección muy similar.

	Dilución	Concentración ng/reacción	$C_T$ (promedio)	Desviación estándar (+/-)	N° de copias
T° apareamiento 55°C	Sin dilución	204,4	22,93	0,12	62000
	1	20,44	25,88	0,14	6200
	2	2,044	28,77	0,37	620
	3	0,2044	32,42	0,58	62
T° apareamiento 60°C	Sin dilución	366,4	25,60	0,18	110000
	1	20	27,52	0,12	6000
	2	2	30,83	0,14	600
	3	0,20	35,38	1,18	60

Tabla 7: Valores de  $C_T$  obtenidos al amplificar un fragmento del gen HBB: de acuerdo a la concentración o número de copias del gen que codifica la  $\beta$ -Globina usando temperaturas de apareamiento de 55°C y 60°C

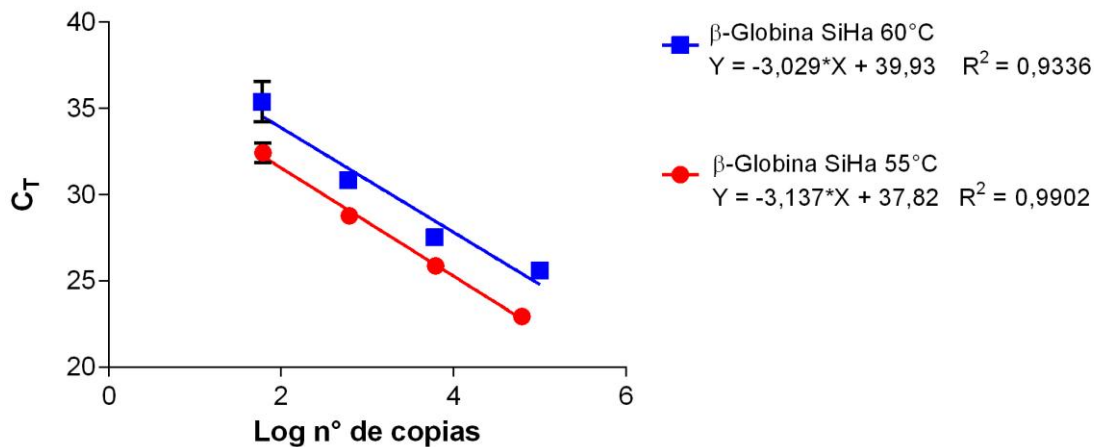


Figura 16: Curvas de calibración obtenidas al amplificar un fragmento del gen HBB para temperaturas de apareamiento de 55°C (rojo) y 60°C (azul). Se grafica los  $C_T$ s obtenidos a las diferentes diluciones v/s el Log del número de copias calculado según la concentración de DNA. El índice de correlación fue  $R^2 > 0,9$ . Todos los ensayos fueron realizados por triplicado. Se graficaron las desviaciones estándar para cada punto, las que sólo se logran visualizar en uno de los puntos (negro).

#### 4. Evaluación de la correlación entre los hallazgos moleculares y la información clínica-epidemiológica de las pacientes infectadas con HPV-16

Para conocer la carga viral de HPV mediante la evaluación de los genes L1 y E7 como marcadores moleculares en las muestras en estudio, se seleccionaron muestras clínicas que presentaban lesiones con diferentes grados de severidad. En ellas se calculó la carga viral normalizada de cada gen mediante la razón entre el número de copias del gen viral versus el número de copias del gen que codifica la  $\beta$ -Globina [40]. De las 40 muestras seleccionadas como positivas para HPV-16 mediante PCR-RLB, todas resultaron positivas para el gen HBB y también en la detección de los genes virales L1 y E7. Luego de realizar el cálculo de la carga viral de HPV mediante la evaluación de L1 y E7 en cada una de las muestras, se analizó la correlación que existía entre ambos marcadores moleculares, obteniéndose un índice de correlación de *Spearman*  $r = 0,7225$  ( $P < 0,0001$ ) que indica una alta correlación entre ambos marcadores (Figura 17).



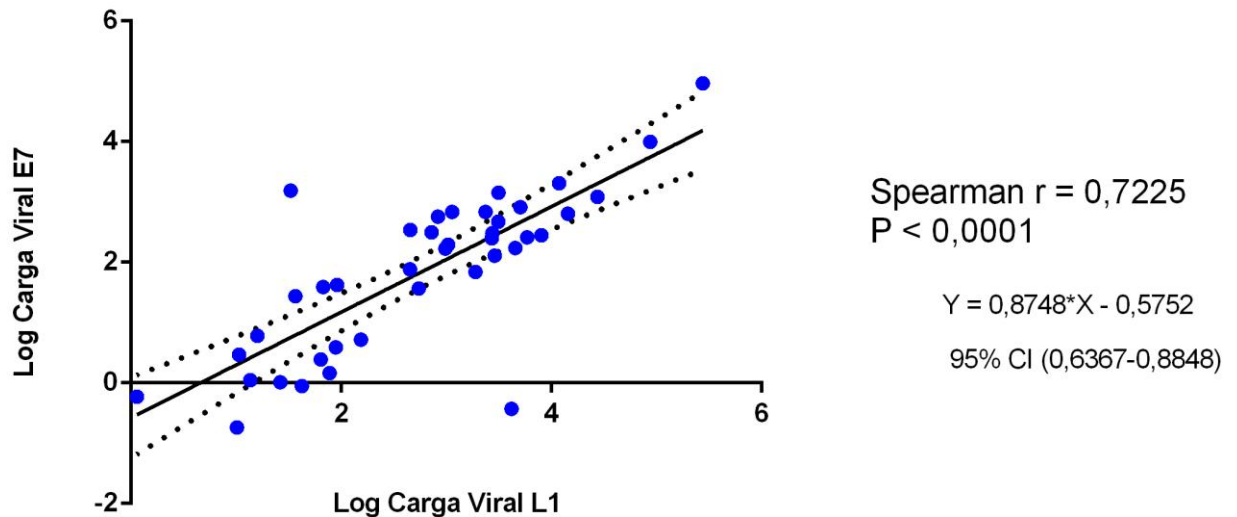


Figura 17: Correlación de la carga viral de HPV-16 obtenida mediante L1 y E7. La línea continua representa la ecuación de la regresión lineal de los puntos ( $Y = 0,8748X - 0,5752$ ,  $R^2=0,6262$ ). La línea discontinua representa en 95% de intervalo de confianza (0,6367 a 0,8848).

Se realizaron diferentes análisis estadísticos para evaluar la correlación entre el grado de lesión y la carga viral. Al realizar el análisis de *Kruskal-Wallis* a los datos entregados por la gráfica del marcador molecular L1, se encuentra una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,0001$ ) entre los 4 grupos en estudio (Figura 18A). Al comparar la carga viral entre los diferentes NIE y grupo control, mediante la prueba de *Mann-Whitney*, se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se analizó los tres grupos de lesiones NIE con el grupo control, presentando en cada uno de los análisis  $P < 0,0001$ . Cabe mencionar que en la Figura 18A se observa en el grupo control un par de muestras que presentarían carga viral. Esto se puede deber a que el método de PCR en tiempo real presenta una mayor sensibilidad en comparación con el PCR-RLB y logra detectar un número menor de copias del gen. Al analizar los diferentes grupo NIE, sólo se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se analiza NIE I con NIE III, obteniéndose un valor  $P=0,0264$  (Figura 18A). Además, se realizó el análisis de los grupos NIE agrupándolos según la clasificación *Bethesda* como lesión de bajo grado (LIBG), que correspondía a lesiones NIE I y lesión de alto grado (LIAG) que corresponde a NIE II y NIE III (Figura 18B). Se realizó la prueba de *Mann-Whitney*, encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $P=0,0208$ ).

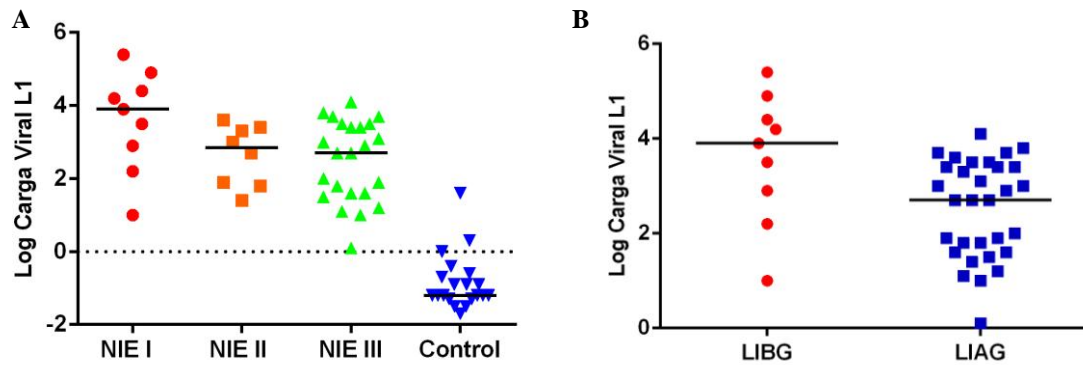


Figura 18: Relación de la carga viral cuantificada mediante el marcador L1 y el grado de lesión en las muestras clínicas de las pacientes. (A) Se observó una diferencia estadísticamente significativa al analizar por *Kruskal-Wallis* los 4 grupos ( $P < 0,0001$ ). Cuando se realizó el análisis entre dos grupos diferentes (*Mann-Whitney*), se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupo NIE con el grupo control, obteniéndose  $P < 0,0001$ . Además, se encontró una diferencia estadísticamente significativa cuando se analizó NIE I con NIE III ( $P = 0,0264$ ). (B) Análisis de grupos con LIBG (NIE I) y LIAG (NIE II + III). Mediante análisis de *Mann-Whitney* se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $P = 0,0208$ ). En ambos gráficos, las líneas continuas representan a las medianas.

Al analizar el comportamiento de la carga viral obtenida al analizar al amplicón del gen E7 en los diferentes grados de lesiones citológicas estudiadas, la prueba de *Kruskal-Wallis* arrojó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,0001$ ) entre los 4 grupos (Figura 19A). Al realizar la comparación entre los diferentes grupos mediante la prueba de *Mann-Whitney*, se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se comparan los tres grupos NIE con el grupo control, encontrándose en las tres comparaciones  $P < 0,0001$ . Al comparar los tres grupos NIE sólo se encontró diferencia estadísticamente significativa entre NIE I y NIE II, resultando un  $P = 0,0138$  (Figura 19A). Al igual como se realizó con L1, se agruparon las diferentes lesiones según la clasificación de *Bethesda* y se realizó la comparación entre los grupos mediante la prueba de *Mann-Whitney*. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos ( $P = 0,0326$ ) (Figura 19B).

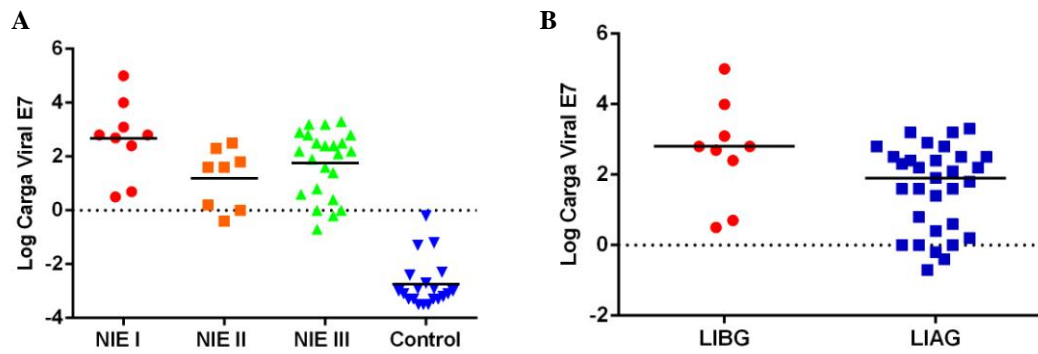


Figura 19: Relación de la carga viral cuantificada mediante el marcador E7 y el grado de lesión en las muestras clínicas de las pacientes. (A) Se observó una diferencia estadísticamente significativa al analizar por *Kruskal-Wallis* los 4 grupos ( $P < 0,0001$ ). Cuando se realizó el análisis entre dos grupos diferentes (*Mann-Whitney*), se encontró diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupo NIE con el grupo control, obteniéndose  $P < 0,0001$ . Además se encontró una diferencia estadísticamente significativa cuando se analizó NIE I con NIE II ( $P = 0,0138$ ). (B) Análisis de grupos LIBG y LIAG. Mediante análisis de *Mann-Whitney* se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $P = 0,0326$ ). En ambos gráficos, las líneas continuas representan a las medianas.

## VII. DISCUSIÓN

Se ha estudiado ampliamente que el diagnóstico de la infección por HPV de alto riesgo es un indicador de la posible aparición de lesiones en la región cervical [44, 45]. Sin embargo, el progreso de la infección está asociado a otros factores que en definitiva condicionan el curso de la evolución clínica de los pacientes, tales como: el hábito de fumar, cantidad de partos, número de parejas sexuales, uso de anticonceptivos, etc. [46]. En edades tempranas del inicio de actividad sexual, donde frecuentemente se encuentra el mayor número de parejas, la prevalencia del virus papiloma puede llegar al 40% en la población femenina, las que manifiestan principalmente citología normal o con pequeños cambios. En contraste con el grupo de mujeres mayores de 30 años, donde la prevalencia se encuentra entre el 5-10% [47]. La vida media de la infección con HPV se estima entre 8 a 10 meses para los tipos de alto riesgo. Es importante enfatizar que sobre el 90% de las infecciones por HPV se resuelven espontáneamente y que en un pequeño grupo de personas éstas permanecen como persistentes, convirtiéndose así la persistencia en un importante factor para la evolución a lesiones de mayor grado [47].

Actualmente, no existe un consenso respecto a los biomarcadores que permiten predecir la evolución de la infección viral o pronóstico clínico de las lesiones en pacientes infectados. Se han propuesto numerosos biomarcadores para evaluar el progreso de las lesiones causadas por la infección de HPV. Algunas investigaciones han señalado que la cuantificación de RNAm de los oncogenes E6 y E7 sería más específica que la cuantificación del DNA viral en mujeres con citología anormal. Una carga alta de estos transcritos sería indicador de lesiones de mayor severidad [33, 48]. Otros parámetros son la integración de DNA de HPV y la interrupción del gen E2, medido mediante la razón de la carga viral de E2 vs E6 (E2/E6). Los estudios han mostrado resultados disímiles. Algunos han señalado que a medida que aumenta la severidad de las lesiones disminuye significativamente E2/E6, sugiriendo que a medida que aumenta el grado de la lesión aumentaría la forma integrada. Sin embargo, otras investigaciones demuestran que lesiones NIE I albergan la forma integrada pura. Estos hallazgos indicarían que la integración por sí sola no es suficiente para evaluar la progresión a lesiones de mayor severidad [49, 50]. Resultados previos ponen de manifiesto la necesidad de nuevos estudios para definir biomarcadores de pronóstico adecuados. La carga del DNA viral se ha propuesto como un eventual candidato. Sin embargo, los trabajos previos han mostrado resultados dispares, posiblemente asociados a las

diferencias en las metodologías empleadas para el análisis. Como por ejemplo la técnica Híbrido de Captura II, la cual no realiza un análisis de la cantidad de células existentes en la muestra, lo que puede variar sustancialmente entre una muestra y otra, afectando finalmente el resultado de la carga viral encontrado. Además, esta técnica entrega un resultado global de la carga viral encontrada, la que podría representar una infección única o múltiple de los 13 genotipos detectados por el test [51]. Aún así, esta técnica es utilizada en varios estudios como estrategia de medición de la carga viral, como en la investigación donde mediante la medición de unidades relativas de luz (RLU, por sus siglas en inglés *Relative Lights Units*) se determinó que altas cargas virales de HPV serían predictivas de la severidad de las lesiones en el cuello del útero [52]. Otro estudio que evalúa la cuantificación del gen L1 mediante PCR en tiempo real con *Sybr Green*, determinó diferencias de la carga viral entre las pacientes con citología normal en comparación con aquellas que presentan citología anormal. Sin embargo, éste no fue capaz de distinguir entre lesiones de bajo o alto grado [53]. Resultados similares se han obtenido al comparar la detección de HPV de alto riesgo por PCR en tiempo real con sondas tipo *TaqMan* y mediante tecnología de *Luminex* [30]. Sin embargo, mediante qPCR con sonda *TaqMan* se encontró que mujeres infectadas con HPV-16 y con lesiones intraepiteliales de alto grado (LIAG) tenían cargas virales promedio de 75 copias de DNA de HPV/célula. En tanto que aquellas con lesiones intraepiteliales de bajo grado (LIBG) se detectó 9 copias de DNA HPV/célula y en mujeres con citología normal fue 0,7 copias. Estos y otros estudios han señalado que las lesiones de mayor grado presentarían una alta carga viral de HPV-16 [54, 55]. Los resultados obtenidos en nuestra investigación también demuestran que existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que presentan lesiones intraepiteliales y el grupo control, considerando ambos genes virales estudiados (L1 y E7). Cuando se agruparon las lesiones en bajo y alto grado se encontró una relación entre ellas. Sin embargo, cuando se analizan los NIE por separado no se encontró una tendencia en ellos, exceptuando que en todos los casos hubo una diferencia con el control. En nuestra opinión, si aumentásemos el número de muestras analizadas se podría visualizar con mayor claridad las tendencias de la carga viral en cada uno de los tipos de lesiones, es decir: NIE I, II y III.

Estudios previos han sugerido que la presencia de una infección con HPV-16 y con alta carga viral es mejor predictor del desarrollo de lesiones de mayor grado, en comparación con la carga viral de otros tipos virales de alto riesgo oncogénico, tales

como HPV-18, HPV-31, HPV-45 y HPV-58. Éstos no muestran un aumento de la carga viral cuando existen lesiones de mayor grado [56, 57]. Además, se ha propuesto que cargas virales altas de HPV-16 serían útiles para diagnosticar el desarrollo de nuevas lesiones de alto grado, lo cual no se reproduciría en infecciones con otros HPV de alto riesgo diferentes de HPV-16 [58]. Las diferencias en la carga viral de HPV-16 en comparación con los otros HPV-AR se podría deber a las diferencias en la replicación que presentan los diferentes genotipos de HPV. La replicación de este virus es un proceso en el cual participan un gran número de proteínas y pequeñas diferencias en las interacciones entre las macromoléculas implicadas en la replicación pueden representar grandes diferencias en las cargas virales encontradas en los estudios antes mencionados [57]. Se ha identificado que en lesiones cervicales malignas el genotipo HPV-16 presentaría múltiples alteraciones en la secuencia de los elementos de control *cis* en la región regulatoria, lo que incrementaría la transcripción viral y la capacidad de establecer la persistencia y la inmortalización de las células [59].

Un estudio de seguimiento de pacientes con citología normal y anormal ha sugerido que las mujeres que presentan mayores cargas virales de HPV-16 son más propensas a desarrollar lesiones intraepiteliales [60]. Así, se ha estimado que una paciente con una carga viral superior a  $2,4 \times 10^4$  copias/raspado tendría un riesgo relativo 7 veces mayor a desarrollar LIAG en comparación con pacientes que presentan cargas virales inferiores. Otra investigación, realizada con material de archivo, estimó que pacientes con alta carga viral tenían un riesgo 70 veces mayor de desarrollar carcinoma cervical *in situ* comparado con aquellas negativas para HPV-16 [61]. En nuestra investigación, hemos obtenido resultados diferentes a los antes señalados. Nosotros hemos encontrado que en lesiones de mayor grado (NIE II + III) la carga viral es significativamente menor a aquellas determinadas en las lesiones de menor grado. Nuestros resultados no son sorprendentes si consideramos otras investigaciones. Un estudio previo determinó que la carga viral absoluta es más alta en aquellas mujeres que presentan lesiones intraepiteliales en comparación con aquellas que no presentan lesión. Sin embargo, se determinó que aquellas pacientes que tenían cargas virales más bajas de HPV-16 presentaban una mayor frecuencia en el desarrollo de lesiones cervicales [62]. Bajas cargas virales han sido descritas en mujeres que presentan lesiones intraepiteliales. Esto se podría explicar debido a que la integración del genoma viral, junto con la desregulación de la síntesis del DNA viral, podría afectar la activación del sistema inmune reduciendo la probabilidad de que la infección sea eliminada [62]. Se ha

encontrado que la falta de respuesta al antígeno E6 de HPV-16 por medio de los linfocitos T citotóxicos podría ser importante en la persistencia de la infección por HPV-16 [63].

Por otra parte, está bien establecido que la infección persistente con HPV de alto riesgo, especialmente HPV-16, se asocia con el riesgo a desarrollar lesiones de mayor grado y cáncer cérvico-uterino [64]. Un estudio de las cargas virales en pacientes infectadas con HPV-16 en forma transitoria y persistente demostró en las infecciones persistentes una carga viral estadísticamente menor comparada con las infecciones transitorias [65]. En consecuencia, se ha sugerido que la carga viral disminuiría a medida que avanzan las lesiones cervicales precursoras del cáncer, pero dicha carga viral se incrementaría en las etapas de cáncer [66]. Esta hipótesis propone que altas cargas virales en estados iniciales de desarrollo de las lesiones aumentarían la probabilidad de la integración del DNA viral en el genoma del hospedero, y que una vez se seleccionen las células que evolucionarán a lesiones de mayor grado, la carga viral disminuiría nuevamente. Esta hipótesis podría explicar los resultados obtenidos en nuestra investigación, donde encontramos cargas virales elevadas en lesiones de bajo grado que podrían colaborar con la integración del genoma viral al hospedero. Una vez que esto sucede, la carga viral disminuiría en lesiones de alto grado hasta el desarrollo de cáncer, donde aumentaría nuevamente. Lamentablemente, el diseño de nuestro estudio no contempló el análisis de muestras (biopsias) de pacientes con cáncer cervical, que permitiera evaluar la hipótesis antes planteada. Alternativamente, podría desarrollarse un seguimiento de pacientes para medir la carga viral en diferentes períodos y estadíos de las lesiones.

Como eventuales marcadores de pronóstico de infección con HPV se han evaluado en forma independiente la carga viral cuantificada mediante la amplificación de segmentos de los genes L1, E6 y E7, como también la integración del genoma viral mediante la razón E2/E6. Nuestro enfoque experimental fue determinar simultáneamente la carga viral usando los genes L1 y E7. Esta estrategia permitiría medir la cuantía del genoma viral y evaluar indirectamente su integridad dentro de las células infectadas. Para evaluar lo anterior, fue necesario analizar los valores de carga viral a través de un estadígrafo que minimizara las diferencias en la eficiencia de cada ensayo de PCR [67]. Nuestros resultados de carga viral determinada a través de L1 y E7 mostraron un índice de correlación de *Spearman* 0,7225, demostrando una correlación lineal positiva entre ambos marcadores. Es decir, al aumentar la carga viral medida a

través de L1 también aumentó la carga viral evaluada mediante E7. Estos hallazgos son similares a los determinados en estudios previos realizados con L1 y E6, cuyos índices de correlación de *Spearman* estuvieron en el rango de 0,84-0,88. [68, 69]. Otro de los resultados obtenidos en esta investigación, y que podría apoyar aún más la relación que existe entre L1 y E7, es que al realizar el análisis en las pacientes infectadas con HPV-16 se determinó que la mediana de la carga viral cuantificada mediante el marcador L1 en LIBG es 1,4 veces mayor en comparación con la encontrada en las LIAG. Esto se respalda al analizar la carga viral obtenida al analizar E7, donde se encontró que es 1,5 veces mayor en LIBG en comparación con las LIAG.

Si bien estos hallazgos se contradicen con la hipótesis planteada inicialmente en esta investigación, podrían contribuir a dilucidar cuál es el comportamiento de la carga viral en el desarrollo de lesiones cervicales. Finalmente, para comprobar esta hipótesis se debería incluir un mayor número de muestras, incorporando muestras de pacientes con cáncer del cuello del útero, o bien realizar un seguimientos a pacientes infectadas para analizar la evolución de la carga viral a través de los diferentes estadios de las lesiones cervicales.



## VIII. CONCLUSIONES

- Se implementó y validó una metodología para la determinación de la carga viral de HPV-16 mediante la amplificación de fragmentos de los genes L1 y E7.
- Se cuantificó la carga viral en muestras positivas para la infección con HPV-16 en pacientes con diferentes grados de lesiones cervicales intraepiteliales.
- Se estableció la existencia de una alta correlación entre el nivel de la carga viral obtenida a través de los genes L1 y E7.
- Se determinó que existe una disminución de la carga viral a medida que aumenta el grado de la lesión, tanto al evaluar la carga viral a través del gen L1 como del gen E7.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Barzon L., Militello V., Pagni S., Franchin E., Dal Bello F., Mengoli C., Palù G., *Distribution of human papillomavirus types in the anogenital tract of females and males*. J Med Virol, 2010. **82**(8): p. 1424-30.
2. Bernard H.U., Burk R.D., Chen Z., van Doorslaer K., zur Hausen H., de Villiers E.M., *Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments*. Virology, 2010. **401**(1): p. 70-9.
3. Modis Y., Trus B.L., Harrison S.C., *Atomic model of the papillomavirus capsid*. EMBO J, 2002. **21**(18): p. 4754-62.
4. Burd E.M., *Human papillomavirus and cervical cancer*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(1): p. 1-17.
5. Eide M.L., Debaque H., *HPV detection methods and genotyping techniques in screening for cervical cancer*. Ann Pathol, 2012. **32**(6): p. e15-23, 401-9.
6. de Villiers E.M., Fauquet C., Broker T.R., Bernard H.U., zur Hausen H., *Classification of papillomaviruses*. Virology, 2004. **324**(1): p. 17-27.
7. Mistry N., Wibom C., Evander M., *Cutaneous and mucosal human papillomaviruses differ in net surface charge, potential impact on tropism*. Virol J, 2008. **5**: p. 118.
8. O'Conner M., *Transcription factor binding sites in the long control region of genital HPVs*, in *Human Papillomavirus*, H.U. Bernard, Editor. 1995: Los Alamos, Mexico. p. 21-40.
9. Gutierrez-Xicotencatl L., Plett-Torres T., Madrid-González C.L., Madrid-Marina V., *Molecular diagnosis of human papillomavirus in the development of cervical cancer*. Salud Publica Mex, 2009. **51 Suppl 3**: p. S479-88.
10. *Human papillomavirus vaccines: WHO position paper, October 2014*. Wkly Epidemiol Rec, 2014. **89**(43): p. 465-91.
11. Melo A., García P., Capurro I., Guzmán P., Brebi P., Ili C., López J., Roa J.C., *[Human papillomavirus genotyping in cervical adenocarcinoma in the Region of La Araucania-Chile]*. Rev Chilena Infectol, 2010. **27**(4): p. 297-301.
12. Chang J.T., Kuo T.F., Chen Y.J., Chiu C.C., Lu Y.C., Li H.F., Shen C.R., Cheng A.J., *Highly potent and specific siRNAs against E6 or E7 genes of HPV16- or HPV18-infected cervical cancers*. Cancer Gene Ther, 2010. **17**(12): p. 827-36.
13. Doorbar J., *Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer*. Clin Sci (Lond), 2006. **110**(5): p. 525-41.
14. Raff A.B., Woodham A.W., Raff L.M., Skeate J.G., Yan L., Da Silva D.M., Schelhaas M., Kast W.M., *The evolving field of human papillomavirus receptor research: a review of binding and entry*. J Virol, 2013. **87**(11): p. 6062-72.
15. Letian T., Tianyu Z., *Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus*. Virol J, 2010. **7**: p. 2.
16. Schiller J.T., Day P.M., Kines R.C., *Current understanding of the mechanism of HPV infection*. Gynecol Oncol, 2010. **118**(1 Suppl): p. S12-7.
17. Moody C.A., Laimins L.A., *Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(8): p. 550-60.
18. Woodman C.B., Collins S.I., Young L.S., *The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues*. Nat Rev Cancer, 2007. **7**(1): p. 11-22.
19. Wheeler C.M., *Natural history of human papillomavirus infections, cytologic and histologic abnormalities, and cancer*. Obstet Gynecol Clin North Am, 2008. **35**(4): p. 519-36; vii.
20. Sousa H., Santos A.M., Pinto D., Medeiros R., *Is there a biological plausibility for p53 codon 72 polymorphism influence on cervical cancer development?* Acta Med Port, 2011. **24**(1): p. 127-34.
21. Gullo C.E., Dami A.L., Barbosa A.P., Marques A.M., Palmejani M.A., de Lima L.G., Bonilha J.L., *Results of a control quality strategy in cervical cytology*. Einstein (Sao Paulo), 2012. **10**(1): p. 86-91.
22. Katyál S., Mehrotra R., *Complementary procedures in cervical cancer screening in low resource settings*. J Obstet Gynaecol India, 2011. **61**(4): p. 436-8.
23. Park Y., Lee E., Choi J., Jeong S., Kim H.S., *Comparison of the Abbott RealTime High-Risk Human Papillomavirus (HPV), Roche Cobas HPV, and Hybrid Capture 2 assays to direct sequencing and genotyping of HPV DNA*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(7): p. 2359-65.
24. Lapierre S.G., Sauthier P., Mayrand M.H., Dufresne S., Petignat P., Provencher D., Drouin P., Gauthier P., Dupuis M.J., Michon B., Ouellet S., Hadjeres R., Ferenczy A., Franco

- E.L., Coutlée F., *Human papillomavirus (HPV) DNA triage of women with atypical squamous cells of undetermined significance with cobas 4800 HPV and Hybrid Capture 2 tests for detection of high-grade lesions of the uterine cervix*. J Clin Microbiol, 2012. **50**(4): p. 1240-4.
25. Castle P.E., Porras C., Quint W.G., Rodriguez A.C., Schiffman M., Gravitt P.E., González P., Katki H.A., Silva S., Freer E., Van Doorn L.J., Jiménez S., Herrero R., Hildesheim A., CVT Group., *Comparison of two PCR-based human papillomavirus genotyping methods*. J Clin Microbiol, 2008. **46**(10): p. 3437-45.
  26. Ritari J., Hultman J., Fingerroos R., Tarkkanen J., Pullat J., Paulin L., Kivi N., Auvinen P., Auvinen E., *Detection of human papillomaviruses by polymerase chain reaction and ligation reaction on universal microarray*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e34211.
  27. Ho C.M., Cheng W.F., Chu T.Y., Chen C.A., Chuang M.H., Chang S.F., Hsieh C.Y., *Human papillomaviral load changes in low-grade squamous intraepithelial lesions of the uterine cervix*. Br J Cancer, 2006. **95**(10): p. 1384-9.
  28. Munoz N., Bosch F.X., Castellsagué X., Díaz M., de Sanjose S., Hammouda D., Shah K.V., Meijer C.J., *Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective*. Int J Cancer, 2004. **111**(2): p. 278-85.
  29. Xi L.F., Hughes J.P., Castle P.E., Edelstein Z.R., Wang C., Galloway D.A., Koutsky L.A., Kiviat N.B., Schiffman M., *Viral load in the natural history of human papillomavirus type 16 infection: a nested case-control study*. J Infect Dis, 2011. **203**(10): p. 1425-33.
  30. Schmitt M., Depuydt C., Benoy I., Bogers J., Antoine J., Pawlita M., Arbyn M., VALGENT study group., *Viral load of high-risk human papillomaviruses as reliable clinical predictor for the presence of cervical lesions*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2013. **22**(3): p. 406-14.
  31. Guo M., Sneige N., Silva E.G., Jan Y.J., Cogdell D.E., Lin E., Luthra R., Zhang W., *Distribution and viral load of eight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma*. Mod Pathol, 2007. **20**(2): p. 256-66.
  32. Kraus I., Molden T., Holm R., Lie A.K., Karlsen F., Kristensen G.B., Skomedal H., *Presence of E6 and E7 mRNA from human papillomavirus types 16, 18, 31, 33, and 45 in the majority of cervical carcinomas*. J Clin Microbiol, 2006. **44**(4): p. 1310-7.
  33. Lamarq L., Deeds J., Ginzinger D., Perry J., Padmanabha S., Smith-McCune K., *Measurements of human papillomavirus transcripts by real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction in samples collected for cervical cancer screening*. J Mol Diagn, 2002. **4**(2): p. 97-102.
  34. de Boer M.A., Jordanova E.S., Kenter G.G., Peters A.A., Corver W.E., Trimbois J.B., Fleuren G.J., *High human papillomavirus oncogene mRNA expression and not viral DNA load is associated with poor prognosis in cervical cancer patients*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(1): p. 132-8.
  35. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J., *Rapid and simple method for purification of nucleic acids*. J Clin Microbiol, 1990. **28**(3): p. 495-503.
  36. de Roda Husman A.M., Walboomers J.M., van den Brule A.J., Meijer C.J., Snijders P.J., *The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR*. J Gen Virol, 1995. **76** ( Pt 4): p. 1057-62.
  37. Shuman S., *Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32678-84.
  38. Bernard, P., *Positive selection of recombinant DNA by CcdB*. Biotechniques, 1996. **21**(2): p. 320-3.
  39. *Human papillomavirus laboratory manual*. [Manual] 2009; Available from: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO\\_IVB\\_10.12\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2010/WHO_IVB_10.12_eng.pdf); visitado 07 de mayo 2014.
  40. Vera-Uehara C., Sánchez-Alemán M.A., Uribe-Salas F.J., Ramos-Castañeda J., Olamendi-Portugal M.L., Conde-Glez C.J., *HPV infection, risk factors and viral load among Mexican male college students*. Braz J Infect Dis, 2014. **18**(1): p. 71-6.
  41. Lee C., Kim J., Shin S.G., Hwang S., *Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in Escherichia coli*. J Biotechnol, 2006. **123**(3): p. 273-80.
  42. van den Brule A.J., Pol R., Fransen-Daalmeijer N., Schouls L.M., Meijer C.J., Snijders P.J., *GP5+/6+ PCR followed by reverse line blot analysis enables rapid and high-throughput identification of human papillomavirus genotypes*. J Clin Microbiol, 2002. **40**(3): p. 779-87.
  43. Ward J.F., *The yield of DNA double-strand breaks produced intracellularly by ionizing radiation: a review*. Int J Radiat Biol, 1990. **57**(6): p. 1141-50.

44. Cuzick J., Szarewski A., Terry G., Ho L., Hanby A., Maddox P., Anderson M., Kocjan G., Steele S.T., Guillebaud J., *Human papillomavirus testing in primary cervical screening*. *Lancet*, 1995. **345**(8964): p. 1533-6.
45. Paraskeva E., Arbyn M., Sotiriadis A., Diakomanolis E., Martin-Hirsch P., Koliopoulos G., Makrydimas G., Tofoski J., Roukos D.H., *The role of HPV DNA testing in the follow-up period after treatment for CIN: a systematic review of the literature*. *Cancer Treat Rev*, 2004. **30**(2): p. 205-11.
46. Kjellberg L., Hallmans G., Ahren A.M., Johansson R., Bergman F., Wadell G., Angström T., Dillner J., *Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection*. *Br J Cancer*, 2000. **82**(7): p. 1332-8.
47. Castellsague X., *Natural history and epidemiology of HPV infection and cervical cancer*. *Gynecol Oncol*, 2008. **110**(3 Suppl 2): p. S4-7.
48. Kosel S., Burggraf S., Engelhardt W., Olgemöller B., *Increased levels of HPV16 E6\*I transcripts in high-grade cervical cytology and histology (CIN II+) detected by rapid real-time RT-PCR amplification*. *Cytopathology*, 2007. **18**(5): p. 290-9.
49. Cricca M., Morselli-Labate A.M., Venturoli S., Ambretti S., Gentilomi G.A., Gallinella G., Costa S., Musiani M., Zerbini M., *Viral DNA load, physical status and E2/E6 ratio as markers to grade HPV16 positive women for high-grade cervical lesions*. *Gynecol Oncol*, 2007. **106**(3): p. 549-57.
50. Cheung J.L., Lo K.W., Cheung T.H., Tang J.W., Chan P.K., *Viral load, E2 gene disruption status, and lineage of human papillomavirus type 16 infection in cervical neoplasia*. *J Infect Dis*, 2006. **194**(12): p. 1706-12.
51. Briolat J., Dalstein V., Saunier M., Joseph K., Caudroy S., Prétet J.L., Birembaut P., Clavel C., *HPV prevalence, viral load and physical state of HPV-16 in cervical smears of patients with different grades of CIN*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(10): p. 2198-204.
52. Sun C.A., Lai H.C., Chang C.C., Neih S., Yu C.P., Chu T.Y., *The significance of human papillomavirus viral load in prediction of histologic severity and size of squamous intraepithelial lesions of uterine cervix*. *Gynecol Oncol*, 2001. **83**(1): p. 95-9.
53. Al-Awadhi R., Chehadah W., Al-Jassar W., Al-Harmi J., Al-Saleh E., Kapila K., *Viral load of human papillomavirus in women with normal and abnormal cervical cytology in Kuwait*. *J Infect Dev Ctries*, 2013. **7**(2): p. 130-6.
54. Tabora N., Ferrera A., Bakkers J.M., Massuger L.F., Melchers W.J., *High HPV 16 viral load is associated with increased cervical dysplasia in Honduran women*. *Am J Trop Med Hyg*, 2008. **78**(5): p. 843-6.
55. Lo K.W., Yeung S.W., Cheung T.H., Siu N.S., Kahn T., Wong Y.F., *Quantitative analysis of human papillomavirus type 16 in cervical neoplasm: a study in Chinese population*. *J Clin Virol*, 2005. **34**(1): p. 76-80.
56. Lai H.C., Peng M.Y., Nieh S., Yu C.P., Chang C.C., Lin Y.W., Sun C.A., Chu T.Y., *Differential viral loads of human papillomavirus 16 and 58 infections in the spectrum of cervical carcinogenesis*. *Int J Gynecol Cancer*, 2006. **16**(2): p. 730-5.
57. Swan D.C., Tucker R.A., Tortolero-Luna G., Mitchell M.F., Wideroff L., Unger E.R., Nisenbaum R.A., Reeves W.C., Icenogle J.P., *Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type*. *J Clin Microbiol*, 1999. **37**(4): p. 1030-4.
58. Gravitt P.E., Kovacic M.B., Herrero R., Schiffman M., Bratti C., Hildesheim A., Morales J., Alfaro M., Sherman M.E., Wacholder S., Rodriguez A.C., Burk R.D., *High load for most high risk human papillomavirus genotypes is associated with prevalent cervical cancer precursors but only HPV16 load predicts the development of incident disease*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(12): p. 2787-93.
59. Lace M.J., Isacson C., Anson J.R., Lörincz A.T., Wilczynski S.P., Haugen T.H., Turek L.P., *Upstream regulatory region alterations found in human papillomavirus type 16 (HPV-16) isolates from cervical carcinomas increase transcription, ori function, and HPV immortalization capacity in culture*. *J Virol*, 2009. **83**(15): p. 7457-66.
60. van Duin M., Snijders P.J., Schrijnemakers H.F., Voorhorst F.J., Rozendaal L., Nobbenhuis M.A., van den Brule A.J., Verheijen R.H., Helmerhorst T.J., Meijer C.J., *Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance*. *Int J Cancer*, 2002. **98**(4): p. 590-5.
61. Josefsson A.M., Magnusson P.K., Ylitalo N., Sørensen P., Qwarforth-Tubbin P., Andersen P.K., Melbye M., Adami H.O., Gyllensten U.B., *Viral load of human papilloma virus 16 as a*

- determinant for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study.* Lancet, 2000. **355**(9222): p. 2189-93.
62. Del Rio-Ospina L., Soto-De León S.C., Camargo M., Moreno-Pérez D.A., Sánchez R., Pérez-Prados A., Patarroyo M.E., Patarroyo M.A., *The DNA load of six high-risk human papillomavirus types and its association with cervical lesions.* BMC Cancer, 2015. **15**: p. 100.
  63. Nakagawa M., Stites D.P., Patel S., Farhat S., Scott M., Hills N.K., Palefsky J.M., Moscicki A.B., *Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens.* J Infect Dis, 2000. **182**(2): p. 595-8.
  64. Kjaer S.K., Frederiksen K., Munk C., Iftner T., *Long-term absolute risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 3 or worse following human papillomavirus infection: role of persistence.* J Natl Cancer Inst, 2010. **102**(19): p. 1478-88.
  65. Manawapat A., Stubenrauch F., Russ R., Munk C., Kjaer S.K., Iftner T., *Physical state and viral load as predictive biomarkers for persistence and progression of HPV16-positive cervical lesions: results from a population based long-term prospective cohort study.* Am J Cancer Res, 2012. **2**(2): p. 192-203.
  66. Kulmala S.M., Syrjänen S.M., Gyllensten U.B., Shabalova I.P., Petrovichev N., Tosi P., Syrjänen K.J., Johansson B.C., *Early integration of high copy HPV16 detectable in women with normal and low grade cervical cytology and histology.* J Clin Pathol, 2006. **59**(5): p. 513-7.
  67. Morris B.J., *Cervical human papillomavirus screening by PCR: advantages of targeting the E6/E7 region.* Clin Chem Lab Med, 2005. **43**(11): p. 1171-7.
  68. Trevisan A., Schlecht N.F., Ramanakumar A.V., Villa L.L., Franco E.L. Ludwig-McGill Study Group. , *Human papillomavirus type 16 viral load measurement as a predictor of infection clearance.* J Gen Virol, 2013. **94**(Pt 8): p. 1850-7.
  69. Fontaine, J., Gravitt P., Duh L.M., Lefevre J., Pourreaux K., Hankins C., Coutlée F., *High level of correlation of human papillomavirus-16 DNA viral load estimates generated by three real-time PCR assays applied on genital specimens.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(9): p. 2200-7.

Anexo 1

		LacZ $\alpha$ initiation codon				
	M13 Reverse priming site				T3 priming site	
201	CACACAGGAA	ACAGCTATGA	CCATGATTAC	GCCAAGCTCA	GAATTAACCC	TCCTAAAAGG
	GTGTGTCCTT	TGTCGATACT	GGTACTAATG	CGGTTTCGAGT	CTTAATTGGG	AGTGATTTCC
	Spe I	Pst I	Pme I	EcoR I		EcoR I Not I
261	GACTAGTCCT	GCAGGTTTAA	ACGAATTCGC	CCTT	PCR Product	AAGGGC GAATTCGCGG
	CTGATCAGGA	CGTCCAAATT	TGCTTAAGCG	GGA		TCCCCG CTTAAGCGCC
			T7 priming site			M13 Forward (-20) priming site
311	CCGCTAAATT	CAATTCGCC	TATAGTGAGT	CGTATTACAA	TTCCTGGCC	GTCGTTTTAC
	GGCGATTTAA	GTTAAGCGGG	ATATCACTCA	GCATAATGTT	AAGTGACCGG	CAGCAAAATG

