



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Biológicas

**Construcción de un control positivo para la detección de
virus de papiloma humano con genotipos clonados en tándem**

Para obtener el grado de

Licenciada en Biología

Presenta

Dulce María Pérez Hernández

Directora

M. C. Elda Carreón Moreno

Co-Directora

D. C. María Lilia Cedillo Ramírez

Abril 2022



Agradecimientos

A la D. C. María Lilia Cedillo Ramírez por permitir la realización del trabajo en el Centro de Detección Biomolecular.

A la M. C. Elda Carreón Moreno por permitirme la realización de este trabajo con su apoyo y dirección.

Al M. C. José Sergio TecpanecatI Xihuitl por permitirme su tiempo para despejar dudas durante la realización de este trabajo.

A mis amigos que siempre me han acompañado y permitido ser parte de sus vidas.

A quienes compartieron esta etapa conmigo en el Centro de Detección Biomolecular.

Dedicatoria

A mis Abuelos y a mis Padres por siempre apoyarme y alentarme a conseguir mis objetivos con disciplina y esfuerzo, quería retribuir un poco lo que me enseñaron GRACIAS.

A mis hermanos porque la vida con ustedes es más interesante y divertida.

Abreviaturas

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

CaCu: Cáncer Cérvico-uterino

ITS: Infecciones de transmisión sexual.

LIEBG: lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado.

LIEAG: Lesiones intraepiteliales de alto grado.

MNPCR (Multiplex Nested Polymerase Chain Reaction): Múltiple Anidada Reacción en Cadena de la Polimerasa

NCBI (National Center Biotechnology Information): Centro Nacional de Información Bioinformática.

OE-PCR (Overlap Extension Polymerase Chain Reaction): Sobrelapamiento de Extensión por Reacción en Cadena de la Polimerasa.

ORF (Open Reading Frame): marco abierto de lectura

RT-PCR (Reverse Transcription-Polimerase Chain Reaction): transcripción reversa del ARN.

RT-qPCR (Real Time- Polimerase Chain Reaction): reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

VPH: Virus del Papiloma Humano

Resumen

La construcción de ADN recombinante es una tecnología que ha abierto oportunidades a instituciones académicas y centros de investigación a realizar estudios que permiten observar desde la expresión de un gen o grupo de genes hasta la validación de resultados de pruebas estándar de importancia en áreas como la industria alimentaria, legal, salud, entre otros. Para ello, se han empleado una serie de metodologías y técnicas cuyo propósito es aislar, propagar o multiplicar ADN a fin de manipularlo. Algunas de estas metodologías integran elementos como las enzimas de restricción y técnicas basadas en la generación de multímeros de ADN mediante sobrelapamiento de extensión por la reacción en cadena de la polimerasa (OE-PCR), que como resultado generan ADN que procede de orígenes diversos y pueden combinarse para crear una nueva molécula, con nueva información genética y con capacidad de replicarse en un microorganismo como las bacterias. Esta tecnología ha sido de gran importancia en su integración en diversos rubros a nivel mundial, en donde se encuentra la salud, ya que existen diversas enfermedades que aquejan a la población, y han sido un factor importante de mortalidad. Algunas de estas enfermedades se encuentran las Infecciones de Transmisión Sexual (ITS), como la ocasionada por Virus del Papiloma Humano (VPH), cuya infección persistente puede llevar a la aparición de lesiones y Cáncer Cérvico-Uterino, el cual es el cuarto tipo más frecuente de cáncer en mujeres a nivel mundial, por ello un diagnóstico oportuno aunado a una detección temprana es importante para revertir este problema de salud pública, sin embargo, aunque esta tecnología empleada para la detección de ITS como las ocasionadas por VPH es una herramienta muy útil, los costos aún siguen siendo no accesibles para todos, sobre todo en países en vías de desarrollo. El objetivo del trabajo fue la construcción de un control positivo para la detección de VPH con genotipos clonados en tándem. Gracias a la aplicación de estas tecnologías, en este trabajo se logró obtener un multímero de ADN correspondiente a genotipos de Virus del Papiloma Humano de alto riesgo.

Índice

1. Introducción.....	8
2. Antecedentes.....	11
3. Justificación.....	12
4. objetivos.....	13
4.1 Objetivos Generales.....	13
4.2 Objetivos Específicos.....	13
5. Diseño Experimental.....	14
7. Metodología.....	14
7.1 Muestras.....	14
7.2 Diseño y Análisis <i>in silico</i> de oligonucleótidos.....	15
7.2.1 Diseño de oligonucleótidos OE-PCR.....	15
7.2.2 OE-PCR <i>in silico</i>	16
8. Análisis <i>in Vitro</i>	18
8.1 Procesamiento de Material Genético.....	18
8.2 PCR de Verificación Oligonucleótidos OE-PCR/Genotipificación.....	18
8.3 Amplificación de regiones conservadas de los genes E6/E7.....	19
8.3.1 Amplificación E6/E7.....	19
8.3.2 PCR Multiple Anidada.....	20
9. Sobrelapamiento de Extensión por Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	21
9.1 PCR de Verificación genotípica.....	23

9.1.1 PCR Verificación fragmento de los genotipos 45-59.....	23
9.1.2 PCR verificación fragmento de los genotipos 31-45.....	25
9.1.3 PCR verificación fragmento de los genotipos 18-31-45.....	26
9.1.4 PCR verificación fragmento de los genotipos 16-18-31-45.	28
10. PCR Detección VPH nuevo control.....	29
11. Resultados y Discusión.....	30
11.1 Verificación de diseño de oligonucleótidos OE-PCR: análisis <i>in silico</i>	30
11.2 OE-PCR <i>in silico</i>	32
11.3 PCR con oligonucleótidos diseñados: análisis <i>in vitro</i>	36
11.3.1 Amplificación de genes E6/E7.....	36
11.3.2 Amplificación de Genotipos Múltiples.....	37
11.4 Sobrelapamiento de Extensión por Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	41
12. PCR con control nuevo de genotipos (18-31-45) ensamblado en Tándem para detectar genotipo 31.....	45
13. Conclusión.....	46
14. Perspectivas.....	46
15. Bibliografía.....	47
16. Anexos.....	51

1. Introducción

Los virus del papiloma humano (VPH) infectan habitualmente la piel y la superficie mucosa en los seres humanos. Son agentes causales de varios tipos de cáncer, entre ellos el cáncer cérvico-uterino (CaCu), resultado de una infección persistente por uno o más tipos de VPH de alto riesgo. En 2012, a nivel mundial se diagnosticaron 528 000 casos nuevos de CaCu, cuya mortalidad resultó en 266 000 mujeres, de las cuales 231 000 mujeres se encontraban en países de bajos o medianos ingresos y 35 000 mujeres vivían en países de ingresos altos (Broutet N et al., 2016). En 2012, en el continente americano más de 83 000 mujeres fue diagnosticadas con CaCu y casi 36 000 fallecieron por esta enfermedad. La tasa de mortalidad es tres veces más alta en Latinoamérica y el Caribe respecto a Norteamérica haciendo evidente la desigualdad en los sistemas sociales y de acceso a salud (Gaceta Mexicana de Oncología. 2014; Organización panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud, 2018). En México, anualmente se registran 13 960 nuevos casos de CaCu. En el 2013, en un grupo específico de mujeres de 25 años en adelante se registraron 3 771 muertes por tumores malignos por CaCu. Las entidades con mayor mortalidad por CaCu son Morelos, Chiapas y Veracruz (secretaría de Salud, 2015).

Virus del Papiloma Humano

Los VPH son virus pequeños de 45 a 55 nm de diámetro, con una cápside de simetría icosaédrica, sin envoltura conformados por un genoma circular y hélice de doble hebra de ADN de aproximadamente 8 kilobases, contiene 9 o 10 regiones codificantes, denominadas zonas abiertas de lectura (Open Read Fragments por sus siglas en inglés). Las ORFs son secuencias de nucleótidos que codifican proteínas no estructurales involucradas en la regulación de funciones virales, así como proteínas estructurales involucradas de las diferentes partículas del virus (De la Fuente-Villarreal et al., 2010; Unemo et al., 2013).

El genoma del VPH está constituido por 8 genes de los cuales dos tipos lo conforman, aquellos que son codificados en las etapas tempranas de la infección, conocidos como genes E (Early) que codifican proteínas no estructurales, y aquellos

que son codificados durante etapas tardías del ciclo de replicación del mismo, conocidos como L (Late), que codifican proteínas estructurales. Se conocen seis genes tempranos: E1, E2, E4, E6 y E7, y dos tardíos: L1 y L2. Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica. Por otro lado, los genes tardíos codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral (Sanabría, 2009).

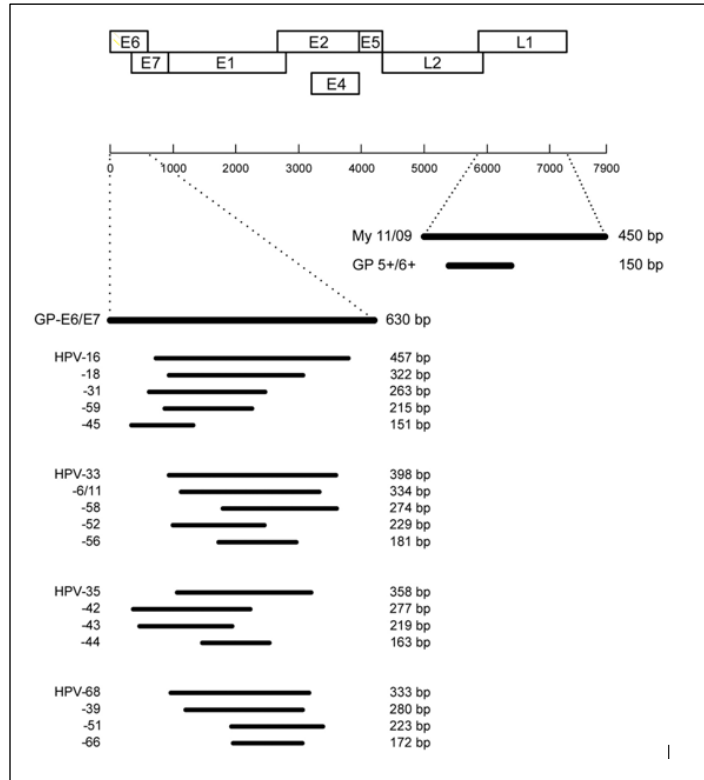
Existen más de 200 tipos diferentes, de los cuales 100 se han secuenciado y 40 se sabe infectan específicamente la mucosa genitoanal de los seres humanos (Unemo et al., 2013). Sin embargo, hay manifestaciones clínicas que incluyen lesiones proliferativas en la piel y las mucosas oral y laríngea (De la Fuente-Villarreal et al., 2010). Los tipos de VPH que se detectan con frecuencia en la zona genitoanal se subdividen en VPH de bajo riesgo asociados con condilomas acuminados y lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LIEBG) cuyos genotipos se encuentra 6, 11, 42, 43 y 44 principalmente y VPH de alto riesgo u oncogénicos, asociados a lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) debido a que pueden ocasionar la aparición de neoplasias malignas tanto en el epitelio escamoso como glandular cuyos genotipos son 16, 18, 30, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 67 y 68 (Sanabría, 2009).

Para la detección de VPH se utilizan pruebas moleculares, debido a que no se pueden cultivar *in vitro*. Algunas pruebas moleculares de detección son la hibridación *in situ*, utilizando sondas para detectar secuencias de ADN, observación de tejido infectado teñido bajo un microscopio y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (De la Fuente-Villarreal D et al., 2010) amplificando secuencias específicas de ADN mediante el uso de oligonucleótidos convencionales y oligonucleótidos degenerados consenso como se observa en el **esquema 1**. Estos oligonucleótidos amplifican secuencias conservadas de genes tanto E (GP-E6/E7) como L My-11/09; GP-5+/6+), así como oligonucleótidos para regiones específicos para cada genotipo (HPV- 16,18, 31, 45, 59; HPV -33, 6/11, 58,52, 58; HPV-35, 42, 43, 44; HPV-68, 39, 51, 66) (Sotlar, K et al., 2004).

Un diagnóstico oportuno aunado a una detección temprana de VPH permite una medida de prevención y/o tratamiento de lesiones que puedan desarrollarse como CaCu (Instituto Nacional del Cáncer, 2020).

Las pruebas de detección para VPH han demostrado tener una mayor sensibilidad en el reconocimiento de secuencias de ácidos desoxirribonucleico (ADN) de VPH (Joshi M., 2010; Heredia-Caballero A. G et al., 2017). Estas pruebas se basan en técnicas de biología molecular, debido a no poder cultivar al virus con métodos clásicos, es decir, requiere de técnicas que demandan tiempo e instalaciones especializadas y costosas de cultivo celular para poder contar con ADN viral requerido para pruebas de detección (Sabater-Cabrera et al., 2017). No obstante, existen una variedad de pruebas comerciales y desarrolladas internamente por laboratorios, sin embargo, en todos los casos se requiere del uso de controles positivos que validen los ensayos (Unemo M et al., 2013).

Una opción para obtener controles positivos es la tecnología del ADN recombinante y técnicas de biología molecular como Sobrelapamiento de extensión por reacción en cadena de la polimerasa (OE-PCR por sus siglas en ingles) que permite clonar secuencias específicas del genoma que proviene de orígenes diversos como alternativa a las empleadas con enzima de restricción (Van der Ent F. & Löwe J. 2006; Lee J 2010; Chun You et al., 2011; Bryksin A. & Matsumura I. 2013; Gómez-Márquez J. 2013).



Esquema 1. Tamaño de fragmentos de genotipos utilizando los oligonucleótidos E6/E7 para detección y tipificación (GP-E6/E7). La genotipificación utilizando una reacción en cadena de la polimerasa múltiple Anidada (MNPCR) agrupada en 4 grupos HPV-16, 18, 31, 45, 59; HPV-33, 6/11, 58,52, 58; HPV-35, 42, 43, 44; HPV-68, 39, 51, 66) tomado de Sotlar (Sotlar, K et al., 2004).

2. Antecedentes

En 2006, De Guglielmo y colaboradores realizaron un estudio sobre el VPH en lesiones intraepiteliales escamosas de cuello uterino, cuyas muestras de pacientes con resultados positivos de ADN viral, se procesaron para ser tipificados mediante una múltiple reacción en cadena de la polimerasa (MPCR) de kit comercial.

En un estudio de Suarez y colaboradores en 2006, detectaron y tipificaron muestras genitales mediante técnicas de biología molecular, utilizando oligonucleótidos consenso y microarreglos (Papillomavirus Clinical Arrays), para detectar 35 genotipos de VPH más frecuentes.

En el 2005, Charles W. Noah y colaboradores realizaron un estudio donde desarrollaron cepas de *Salmonella typhimurium* DT104 y *Escherichia coli* O157:H7, enterohemorrágica para expresar la Proteína Verde Fluorescente modificada (GFP) mediante técnicas de ADN recombinante y un vector pAG408, para ser utilizadas como posibles controles positivos en el análisis de muestras.

En 2006, Amaresh Das y colaboradores, desarrollaron un ARN de control positivo interno para detectar el ARN del Virus de la influenza Aviar mediante oligonucleótidos que amplifican una secuencia del Gen única utilizando transcripción inversa RT-PCR y RT-qPCR en tiempo real.

En 2011, Chun You y colaboradores realizaron un estudio de mutagénesis sitio-dirigida, utilizando el OE-PCR para insertar un multímero de ADN a *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.

3. Justificación

Para poder validar la realización del procedimiento de PCR, es necesario un control positivo, por ello es importante contar con una fuente de controles adecuados, sin embargo, en el caso de VPH una de las fuentes para contar con ello, implica altos costos y la utilización de equipamiento e instalaciones especializadas en el manejo aplicado de cultivos celulares como fuente de genotipos virales. Por otro lado, la PCR en biología molecular ha sido una herramienta muy útil debido a su especificidad y sensibilidad en detección de secuencias de interés como genotipos de alto riesgo, lo cual contribuye a una obtención de más información para un diagnóstico temprano de VPH evitando su desarrollo a formas más graves de la infección.

Por ello, utilizando técnicas moleculares como OE-PCR como técnica de ensamblaje de secuencias de interés que permite la unión de fragmentos de secuencias específicas de ADN para generar un nuevo fragmento, sin el uso de enzimas de restricción.

La generación de estos controles como resultado de OE-PCR nos permitirá obtener clones, los cuales, contribuyen a una fuente más de genotipos de alto riesgo para su detección en el Centro de Detección Biomolecular.

4. Objetivos

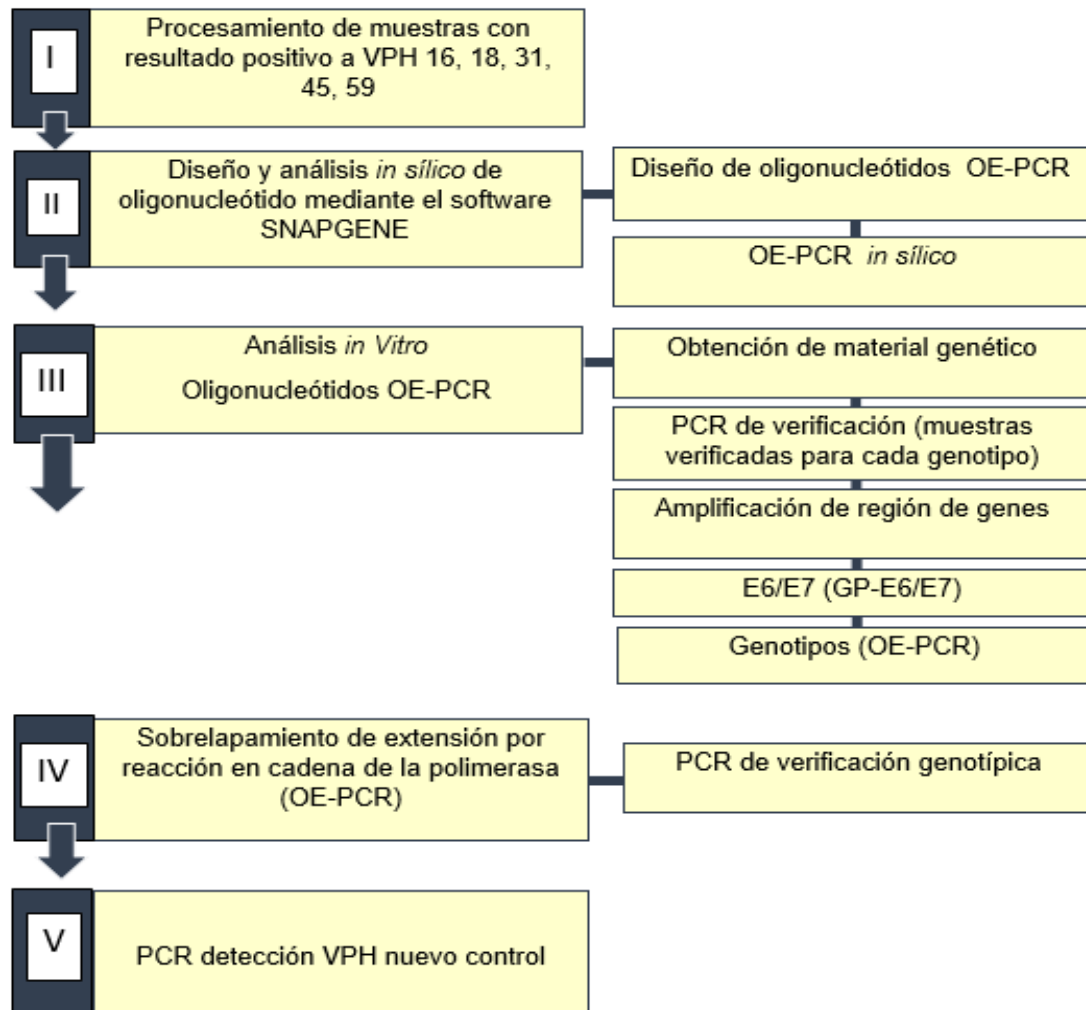
4.1 Objetivo general

Obtener un control positivo interno clonado en tándem mediante sobrelapamiento de extensión por reacción en cadena de la polimerasa para la detección de Virus del papiloma Humano.

4.2 Objetivos específicos

- Procesamiento de muestras con diagnóstico positivo a genotipos 16, 18, 31, 45, 59 de Virus de Papiloma Humano.
- Diseñar oligonucleótidos de sobrelapamiento para cada genotipo *in silico* mediante el Software SNAPGENE.
- Establecer las condiciones para el Sobrelapamiento de extensión por Reacción en Cadena de la Polimerasa (OE-PCR) para la unión genotipos-genotipo.

6. Diseño experimental



7. Metodología

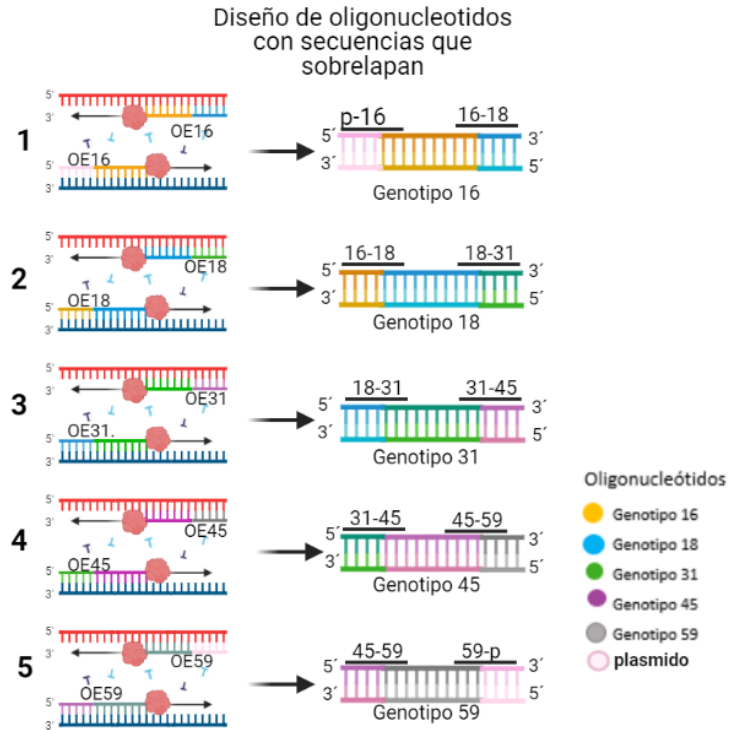
7.1 Muestras

Se trabajó con muestras con resultado positivo a Genotipos de alto riesgo 16, 18, 31, 45, 59 en el Centro de Detección Biomolecular.

7.2 Diseño y análisis *in silico* de Oligonucleótidos

7.2.1 Diseño de Oligonucleótido OE-PCR

Las secuencias utilizadas se obtuvieron de GenBank de NCBI, para genotipo 16 (K02718), 18 (KY502094), 31 (KX638481), 45 (KY565653) y 59 (KU298922). Para el vector de clonación p.Bluescript SK (+) con número de acceso (X52325). Se utilizó el Software SNAPGENE para realizar el diseño de oligonucleótidos para OE-PCR tanto para los genotipos como del plásmido de clonación, siguiendo el protocolo de Bryksin A. & Matsumura I. (Bryksin A & Matsumura I. 2013). También se utilizaron programas como PRIME 3 (Untergasser A et al., 2012), Thermo Fisher Scientific (Termo Fisher Scientific Web Tools 2019). Como se muestra en el **esquema 2**, donde inicialmente se seleccionó el grupo de genotipos de interés para combinar fragmentos de ADN. En el genotipo 16 (amarillo) en la región 5´ tiene superpuestas secuencias de la región terminal 3´ del plásmido (rosa-amarillo) y en el extremo terminal 3´ del genotipo 16, tiene superpuestas secuencias de la región 5´ del genotipo 18 (amarillo-azul). **2)** En el genotipo 18 (azul) en la región 5´ tiene superpuestas secuencias de la región terminal 3´ del genotipo 16 (azul-verde) y en el extremo terminal 3´ del genotipo 18, tiene superpuestas secuencias de la región 5´ del genotipo 31´ (azul-verde). **3)** En el genotipo 31 (verde) en la región 5´ tiene superpuestas secuencias de la región terminal 3´ del genotipo 18 (azul-verde) y en el extremo terminal 3´ del genotipo 31, tiene superpuestas secuencias de la región 5´ del genotipo 45´ (verde-morado). **4)** En el genotipo 45 (morado) en la región 5´ tiene superpuestas secuencias de la región terminal 3´ del genotipo 31 (verde-morado) y en el extremo terminal 3´ del genotipo 45, tiene superpuestas secuencias de la región 5´ del genotipo 59´ (morado-gris). **5)** En el genotipo 59 (gris) en la región 5´ tiene superpuestas secuencias de la región terminal 3´ del genotipo 45 (morado-gris) y en el extremo terminal 3´ del genotipo 59, tiene superpuestas secuencias de la región 5´ del plásmido (morado-rosa) (Van der Ent F, Löwe J. 2006; Nelson M.D, Fitch D.H.A. 2012; You C, Percival Z. 2012).



Created in BioRender.com

Esquema 2. Esquema de diseño de oligonucleótidos para OE-PCR (BioRender 2020).

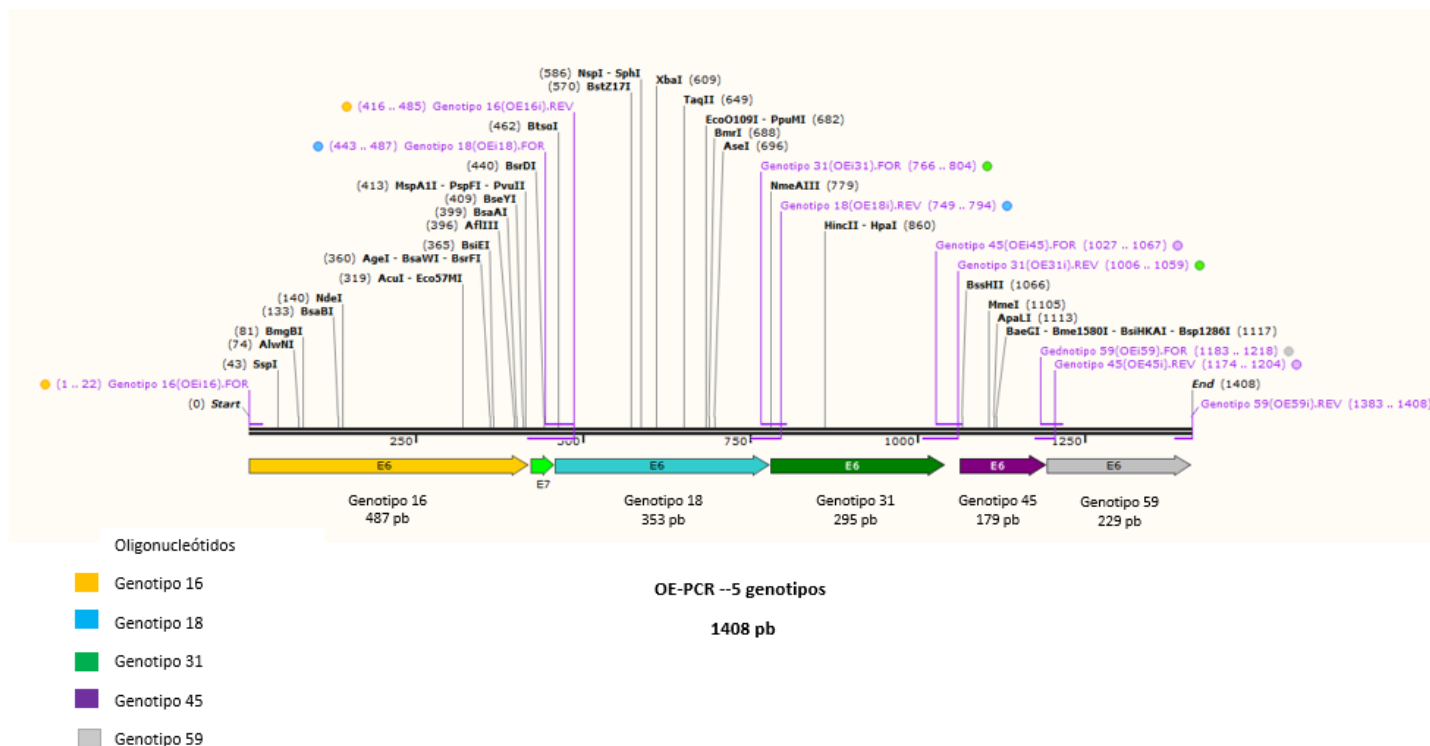
7.2.2 OE-PCR *in silico*

Se realizaron OE-PCR en el programa SNAPGENE utilizando los oligonucleótidos diseñados (**tabla 1**), y el producto amplificado se utilizó como inserto para el ensamble en el plásmido de clonación p. Bluescript SK (+). Se evaluaron los parámetros utilizando herramientas para el cálculo de Tm usando SNAPGENE, Thermo Fisher Scientifics Tools, NEB Tools (Termo Fisher Scientific Web Tools, 2019; NEB, 2019).

Tabla 1. Oligonucleótidos para OE-PCR.

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Tm	pb	GC%
OEi16.FOR	CACAGTTATGCACAGAGCTGCA	59°	22	50
OE16i.REV	TGTTATTTCTATGTCTTGCAGTGAAGTGCATATATTCATGCAATGTAGGTGTATCTCCATGCATGATTAC	68°	70	37
OEi18.FOR	TTGCATGAATATATGCACCTTCACTGCAAGACATAGAAATAACCTG	65°	45	36
OE18i.REV	AGTTCATGCAATTTCTGTTGTGAAATCGTCTGTTTTTCATTAAGGTGT	67°	46	35
OEi31.FOR	GACGATTTCAACAACGAAATTGCATGAACTAAGCTCGGCA	67°	39	44
OE31i.REV	GTAATGCACTTTCCACCACATATACCTTTGTTGTCAATTTTCTAATGTTGT	66°	54	31
OEi45.FOR	AACAAAGGTATATGTGGTGGAAAAGTGCATTACAGGATGGC	66°	41	41
OE45i.REV	GTTCCCTTTGACCTCTGTGCGTTCCAATGT	67°	52	52
OEi59.FOR	CGCACAGAGGTCAAAGGGAACTGCAAGAAAGAGAG	68°	36	53
OE59i.REV	TATAACAGCGTATCAGCAGCTCATGT	60°	26	42

Secuencias de oligonucleótidos para amplificar genotipos para OE-PCR (SNAPGENE, 2019)



Esquema 3. Ensamble de genotipos 16, 18, 31, 45 y 59 producto de OE-PCR, con los Oligonucleótidos del genotipo 16 se obtiene un producto amplificado de 487 pb,

sobrelapando 43 pb con el genotipo 18. Oligonucleótidos del genotipo 18 se obtiene un producto de 353 pb, que sobrelapa 29 pb con el genotipo 31. Oligonucleótidos del genotipo 31 se obtiene un producto de 295 pb, que sobrelapa 33 pb con el genotipo 45. Oligonucleótidos del genotipo 45 se obtiene un producto amplificado de 179 pb, que sobrelapa 22 pb con el genotipos 59. Oligonucleótidos del genotipo 59 se obtiene un producto amplificado de 229 pb. El fragmento obtenido con los 5 genotipos tiene un tamaño de 1408 pb.

8. Análisis *in vitro*

8.1 Procesamiento de material genético

Se utilizaron muestras con diagnostico positivo a genotipo 16, 18, 31, 45 y 59 para realizar extracción de ADN. Siguiendo el protocolo de extracción High Pure Viral Nucleic (ROCHE®), se cuantificó el material genético en nanofotómetro (Nanophotometer IMPLEN®), se almaceno a -20°C.

8.2 PCR de Verificación (muestras verificadas para cada genotipo)

Se realizó PCR utilizando Thermo Scientific™ Dream Taq DNA Polymerases (5U/μL) para verificar que los Oligonucleótidos diseñados (**tabla 1**) amplifiquen los productos esperados, utilizando muestras verificadas para genotipos (16, 18, 31, 45, 59) en el centro de detección biomolecular (**anexo 2: tabla 24**). Con el siguiente protocolo.

Preparación master mix

<i>Reactivos</i>	<i>5 reacciones</i>
<i>H₂O</i>	15.9 μL
<i>Master mix</i>	7.7 μL
<i>Oligonucleótidos (F) Genotipificación/OE-PCR</i>	5 μL
<i>Oligonucleótidos (R) Genotipificación/OE-PCR</i>	5 μL
<i>Templado</i>	2 μL
<i>Volumen final por reacción</i>	25 μL

Programa de amplificación

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95 °C	2 minutos
35	Desnaturalización	95° C	1 minuto
	Alineamiento	55° C	30 segundos
		58° C	30 segundos
		62° C	30 segundos
Extensión	72° C	1 minuto	
1	Extensión final	72° C	10 minutos

El producto de amplificación se visualizó en electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de etidio y expuesto en fotodocumentador (Gel logic 212 PRO), utilizando el software Carestream.

8.3 Amplificación de regiones conservadas de los genes E6/E7

8.3.1 Amplificación E6/E7

Para generar una mayor concentración de ADN de la región E6/E7, para su posterior genotipificación, se realizó una primera PCR con oligonucleótidos degenerados GP E6/E7 a las cinco muestras positivas a genotipos de VPH (16, 18, 31, 45). Utilizando Thermo Scientific™ High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL). Las PCR se realizaron en Labnet™ Termociclador MultiGene. Con el siguiente protocolo.

Preparación de master mix

Reactivo	5 reacciones
H ₂ O	77 μL
5 x Phusion HF Buffer	25 μL
10 mM dNTPs	10 μL
Forware GP-E7-3F (10mM)	5 μL
Reverse GP-E6-5B y GP-E7-6B (10mM)	5 μL
Template DNA	2 μL
Phusion DNA Polymerase	1 μL
Volumen final por reacción	25 μL

Programa de amplificación región E6/E7

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95 °C	2 minutos
35	Desnaturalización	95° C	1 minuto
	Alineamiento	55° C	30 segundos
		58° C	30 segundos
		62° C	30 segundos
Extensión	72° C	1 minuto	
1	Extensión final	72° C	10 minutos

8.3.2 PCR Genotipo individual

Se realizaron cinco reacciones PCR con los oligonucleótidos diseñados (**Tabla 1**) correspondientes a cada genotipo a amplificar, utilizando Thermo Scientific™ Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (2 U/μL). Con el siguiente protocolo.

Preparación de master mix

<i>Reactivo</i>	<i>1 Reacción</i>
<i>H₂O</i>	Adicionar hasta 20 μL
<i>5 X Phusion HF Buffer</i>	4 μL
<i>10 mM dNTPs</i>	2 μL
<i>Forward (10mM)</i>	1 μL
<i>Reverse (10mM)</i>	1 μL
<i>Template DNA</i>	2 μL
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0.2 μL
<i>Volumen</i>	20 μL

Programa de amplificación genotipo Individual (Centro de Detección Biomolecular).

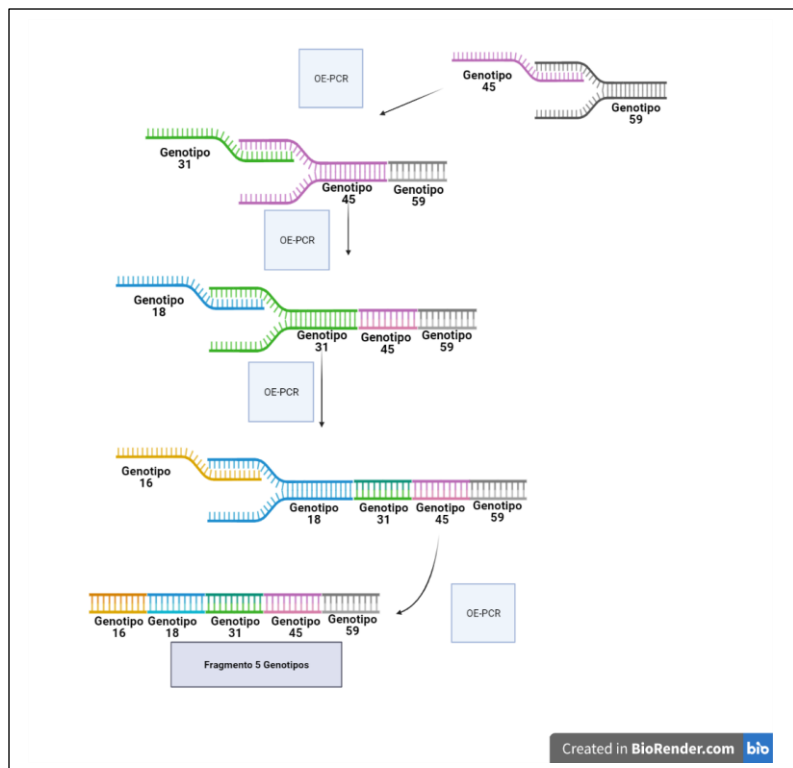
Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95 °C	2 minutos
35	Desnaturalización	95° C	1 minuto
	Alineamiento	55° C	30 segundos
		58° C	30 segundos
		62° C	30 segundos
Extensión	72° C	1 minuto	
1	Extensión final	72° C	10 minutos

5 µl del producto de PCR de cada reacción fue visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de etidio revelado en fotodocumentador (Gel logic 212 PRO), utilizando el software Carestream.

Se obtuvo la medición de concentración de 1 µL de producto final de PCR de cada genotipo amplificado con el nanofotómetro (Nanophotometer IMPLÉN®) para su posterior utilización en la OE-PCR.

9. Sobrelapamiento de Extensión por Reacción en Cadena de la Polimerasa.

En el OE-PCR se utilizó el protocolo de Bryksin & Matsumura (Bryksin & Matsumura, 2013), realizando en tándem la adición de un fragmento a la vez como se muestra en el **esquema 4**.



Esquema 4. Cada fragmento amplificado con los oligonucleótidos diseñados es sobrelapado un fragmento a la vez para unirlos con su correspondiente extremo complementario y formar una sola secuencia producto de OE-PCR.

Para realizar el OE-PCR, se tomaron los fragmentos amplificados con oligonucleótidos diseñados (**tabla 1**), utilizándolos como megaoligonucleótidos, es

decir, sin adición en la mezcla para OE-PCR de oligonucleótido alguno. Calculando la concentración a utilizar de cada genotipo amplificado, basado en protocolo (Nelson M.D., Fitch D.H.A. 2012), en el cual la concentración de cada fragmento amplificado debe ser equimolar en la mezcla de PCR, esto mediante la fórmula (**Anexo 1**) utilizada en el programa BIOMATH (Promega, 2019), donde se coloca el tamaño del fragmento (pb) y la concentración registrada con nanofotometro (Nanophotometer IMPLEN®) convertida en $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ para obtener los $\text{pmol}/\mu\text{L}$ de cada fragmento.

OE-PCR genotipos 45-59

<i>Reactivo</i>	<i>1 Reacción</i>
<i>H₂O</i>	10.77 μL
<i>5 X Phusion HF Buffer</i>	4 μL
<i>10 mM dNTPs</i>	2 μL
<i>(Megaoligonucleotido) Fragmento 45</i>	1.34 μL
<i>(megaoligonucleotido) Fragmento 59</i>	1.69 μL
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0.2 μL
<i>Volumen final</i>	20 μL

Programa de solapamiento

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo	
1	Desnaturalización inicial	98 °C	2 minutos	
25	Desnaturalización	95 °C	1 minuto	
		Alineamiento		55 °C
				58 °C
	62 °C			
Extensión	72° C	1 minuto 30 segundos		
1	Extensión final	72° C	10 minutos	

El producto se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de Etidio (5mg/L) y fotodocumentado con el software Carestream en el equipo (Gel logic 212 PRO).

Se cuantificó 1 µl del producto de PCR en nanofotómetro, y siguiendo el protocolo de Nelson (Nelson M. D., Ficht D. H. A. 2012) para realizar los cálculos de concentración utilizando la herramienta BIOMATH (Promega, 2019).

9.1 PCR verificación genotípica

9.1.1 PCR Verificación fragmento de los genotipos 45-59

Se realizó una PCR para amplificar los genotipos 45-59 adicionando oligonucleótidos (**tabla 1**) OEi45.FOR y OE59i.REV. A fin de verificar el producto de PCR.

Protocolo Master mix genotipos 45-59.

<i>Reactivo</i>	<i>1 Reacción</i>
<i>H₂O</i>	9.8 µL
<i>5 X Phusion HF Buffer</i>	4 µL
<i>10 mM dNTPs</i>	2 µL
<i>OEi45.FOR</i>	1 µL
<i>OE59i.REV</i>	1 µL
<i>Templado Fragmento 45-59</i>	2 µL
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0.2 µL
<i>Volumen final</i>	20 µL

Programa Termociclos

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo	
1	Desnaturalización inicial	98 °C	2 minutos	
25	Desnaturalización	95 °C	1 minuto	
		Alineamiento		55 °C
				58 °C
	62 °C			
Extensión	72° C	1 minuto 30 segundos		
1	Extensión final	72° C	10 minutos	

El producto de PCR se visualizó mediante Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de Etidio (5mg/L) y fotodocumentado con el software Carestream en el equipo (Gel logic 212 PRO).

OE-PCR genotipos 31-45

<i>Reactivo</i>	<i>1 Reacción</i>
<i>H₂O</i>	10.04 µL
<i>5 X Phusion HF Buffer</i>	4 µL
<i>10 mM dNTPs</i>	2 µL
<i>(Megaoligonucleotido) Fragmento 31</i>	1.71 µL
<i>(megaoligonucleotido) Fragmento 45</i>	1.13 µL
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0.2 µL
<i>Volumen final</i>	20 µL

Programa de solapamiento

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo	
1	Desnaturalización inicial	98 °C	2 minutos	
25	Desnaturalización	95 °C	1 minuto	
		Alineamiento		55 °C
				58 °C
	62 °C			
Extensión	72° C	1 minuto 30 segundos		
1	Extensión final	72° C	10 minutos	

El producto de PCR se visualizó mediante Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de Etidio (5mg/L) y fotodocumentado con el software Carestream en el equipo (Gel logic 212 PRO), para comprobar el tamaño del producto, 1 µl de la concentración del amplificado se cuantificó en nanofotómetro (Nanophotometer IMPLEN®).

9.1.2 PCR verificación fragmento de los genotipos 31-45

Se realizó una PCR para amplificar el fragmento de los genotipos 31-45 adicionando oligonucleótidos (**tabla 1**) OEi31.FOR y OEi45.REV. A fin de verificar el producto de PCR.

Protocolo master mix fragmento genotipos 31-45.

<i>Reactivo</i>	<i>1 Reacción</i>
<i>H₂O</i>	9.8 µL
<i>5 X Phusion HF Buffer</i>	4 µL
<i>10 mM dNTPs</i>	2 µL
<i>OEi31.FOR</i>	1 µL
<i>OE45i.REV</i>	1 µL
<i>Templado Fragmento 31 – 45</i>	2 µL
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0.2 µL
<i>Volumen final</i>	20 µL

Programa de termociclos

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo	
1	Desnaturalización inicial	98 °C	2 minutos	
25	Desnaturalización	95 °C	1 minuto	
		Alineamiento		55 °C
				58 °C
	62 °C			
Extensión	72° C	1 minuto 30 segundos		
1	Extensión final	72° C	10 minutos	

El producto de amplificación se visualizó en electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de etidio y expuesto en fotodocumentador (Gel logic 212 PRO), utilizando el software Carestream.

OE-PCR fragmento genotipos 31-45 adición fragmento genotipo 18

<i>Reactivo</i>	<i>1 Reacción</i>
<i>H₂O</i>	10.96 µL
<i>5 X Phusion HF Buffer</i>	4 µL
<i>10 mM dNTPs</i>	2 µL
<i>(Megaoligonucleotido) fragmento 31-45</i>	1.71 µL
<i>(megaoligonucleotido) fragmento 18</i>	1.13 µL
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0.2 µL
<i>Volumen final</i>	20 µL

Programa de solapamiento

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo	
1	Desnaturalización inicial	98 °C	2 minutos	
25	Desnaturalización	95 °C	1 minuto	
		Alineamiento		55 °C
				58 °C
	62 °C			
Extensión	72° C	1 minuto 30 segundos		
1	Extensión final	72° C	10 minutos	

El producto de PCR se visualizó mediante Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de Etidio (5mg/L) y fotodocumentado con el software Carestream en el equipo (Gel logic 212 PRO) para comprobar el tamaño del producto. 1 µl de la concentración del amplificado se cuantificó en nanofotómetro (Nanophotometer IMPLÉN®).

9.1.3 PCR verificación fragmento de genotipos 18-31-45

Se realizó una PCR para amplificar el fragmento de los genotipos 18-31-45 adicionando oligonucleótidos (**tabla 1**) OEi18.FOR y OEi45.REV. A fin de verificar el producto de PCR.

Protocolo Master mix fragmento genotipos 18-31-45.

<i>Reactivo</i>	<i>1 Reacción</i>
<i>H₂O</i>	9.8 µL
<i>5 X Phusion HF Buffer</i>	4 µL
<i>10 mM dNTPs</i>	2 µL
<i>OEi18.FOR</i>	1 µL
<i>OE45i.REV</i>	1 µL
<i>Templado Fragmento 18-31 – 45</i>	2 µL
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0.2 µL
<i>Volumen final</i>	20 µL

Programa de amplificación

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo	
1	Desnaturalización inicial	98 °C	2 minutos	
25	Desnaturalización	95 °C	1 minuto	
		Alineamiento		55 °C
				58 °C
	62 °C			
Extensión	72° C	1 minuto 30 segundos		
1	Extensión final	72° C	10 minutos	

El producto de PCR se visualizó mediante Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de Etidio (5mg/L) y fotodocumentado con el software Carestream en el equipo (Gel logic 212 PRO).

OE-PCR fragmento genotipos 18-31-45 adición fragmento genotipo 16

<i>Reactivo</i>	<i>1 Reacción</i>
<i>H₂O</i>	12 µL
<i>5 X Phusion HF Buffer</i>	4 µL
<i>10 mM dNTPs</i>	2 µL
<i>(Megaoligonucleotido) fragmento 18-31-45</i>	1 µL
<i>(megaoligonucleotido) fragmento 16</i>	0.8 µL
<i>Phusion DNA Polymerase</i>	0.2 µL
<i>Volumen final</i>	20 µL

Programa de solapamiento

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	98 °C	2 minutos
25	Desnaturalización	95 °C	1 minuto
	Alineamiento	55 °C	1 minuto
		58 °C	
		62 °C	
Extensión	72° C	1 minuto 30 segundos	
1	Extensión final	72° C	10 minutos

El producto de PCR se visualizó mediante Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de Etidio (5mg/L) y fotodocumentado con el software Carestream en el equipo (Gel logic 212 PRO), para comprobar el tamaño del producto, 1 µl de la concentración del amplificado se cuantificó en nanofotómetro (Nanophotometer IMPLEN®).

.9.1.4 PCR verificación fragmento de los genotipos 16-18-31-45

Se realizó una PCR para amplificar el fragmento de los genotipos 16-18-31-45 adicionando oligonucleótidos (**tabla 1**) OEi16.FOR y OEi45.REV. A fin de verificar el producto de PCR.

Protocolo Master mix fragmento genotipos 16-18-31-45.

Reactivo	1 Reacción
H ₂ O	9.8 µL
5 X Phusion HF Buffer	4 µL
10 mM dNTPs	2 µL
OEi18.FOR	1 µL
OE45i.REV	1 µL
Templado Fragmento 16-18-31-45	2 µL
Phusion DNA Polymerase	0.2 µL
Volumen final	20 µL

Programa de amplificación

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	98 °C	2 minutos
25	Desnaturalización	95 °C	1 minuto
	Alineamiento	55 °C	1 minuto
		58 °C	
		62 °C	
Extensión	72° C	1 minuto 30 segundos	
1	Extensión final	72° C	10 minutos

El producto de PCR se visualizó mediante Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de Etidio (5mg/L) y fotodocumentado con el software Carestream en el equipo (Gel logic 212 PRO).

10. PCR detección VPH nuevo control

Se utiliza el fragmento ensamblado en tándem mediante OE-PCR de los genotipos 18-31-45 (763 pb) con el siguiente protocolo.

Protocolo Master Mix

<i>Reactivo</i>	<i>1 Reacción</i>
<i>H₂O</i>	8.8µL
<i>Master Mix</i>	3.12 µL
<i>G31.FOR</i>	2 µL
<i>G31.REV</i>	2 µL
<i>Templado</i>	2µL
<i>Templado Fragmento 18-31-45</i>	2µL
<i>Volumen final</i>	20 µL

Programa de amplificación genotipo Individual (para la genotipificación de VPH en el Centro de Detección Biomolecular).

Numero de ciclos	Pasos PCR	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95 °C	2 minutos
35	Desnaturalización	95° C	1 minuto
	Alineamiento	55° C	30 segundos
		58° C	30 segundos
		62° C	30 segundos
Extensión	72° C	1 minuto	
1	Extensión final	72° C	10 minutos

El producto de PCR se visualizó mediante Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido en bromuro de Etidio (5mg/L) y fotodocumentado con el software Carestream en el equipo (Gel logic 212 PRO).

11. Resultados y discusión

11.1 Verificación diseño de oligonucleótidos OE-PCR: análisis *in silico*

En las figuras 1-5 se muestran los resultados del análisis en BLAST/NCBI para los oligonucleótidos que amplifican los genotipos VPH 16,18,31,45 y 59, observando los distintos resultados para cada una de las secuencias similares obtenidas y el E-Value de menor a mayor (Bryksin A & Matsumura I, 2013; Giménez-Alvarado C & Colmenares-Esqueda M, 2015).

Resultados del análisis BLAST para los oligonucleótidos (**tabla 1**) OE-PCR.

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate InDRE_335_complete_genome	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	7909	MN961217.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate InDRE_334_complete_genome	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	7909	MN961216.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate InDRE_331_complete_genome	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	7906	MN961215.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate InDRE_324_complete_genome	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	7909	MN961214.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate InDRE_320_complete_genome	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	7908	MN961213.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate InDRE_316_complete_genome	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	7909	MN961212.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate InDRE_307_complete_genome	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	7905	MN961211.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate InDRE_275_complete_genome	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	7908	MN961210.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 strain HPV-03 transforming protein (E7) gene_complete cds	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	468	MN943495.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 strain HPV-02 transforming protein (E7) gene_complete cds	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	468	MN943494.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 strain HPV-01 transforming protein (E7) gene_complete cds	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	468	MN943493.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 strain E7-958 transforming protein (E7) gene_complete cds	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	468	MN943492.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 strain E7-713 transforming protein (E7) gene_complete cds	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	468	MN943491.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 strain E7-546 transforming protein (E7) gene_complete cds	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	468	MN943490.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate HPV-659 transforming protein (E7) gene_complete cds	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	469	MN881093.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate HPV-658 transforming protein (E7) gene_complete cds	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	469	MN881092.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate HPV-477 transforming protein (E7) gene_complete cds	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	469	MN881091.1
<input checked="" type="checkbox"/> Human papillomavirus type 16 isolate HPV-290 transforming protein (E7) gene_complete cds	Human papillomavirus type 16	78.7	78.7	45%	5e-11	100.00%	469	MN881090.1

Figura 1. Resultado análisis para oligonucleótido que amplifica Genotipo 16 (OEi16), con un porcentaje de identidad de 100%, tomado (NCBI, 2019).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Human papillomavirus type 18 K1872 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC509006.1
Human papillomavirus type 18 K2087 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC509004.1
Human papillomavirus type 18 K1385 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC509003.1
Human papillomavirus type 18 TK032 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC509001.1
Human papillomavirus type 18 K1929 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC508999.1
Human papillomavirus type 18 K1506 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC508998.1
Human papillomavirus type 18 K1092 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC508996.1
Human papillomavirus type 18 K0390 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC508994.1
Human papillomavirus type 18 K0280 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC508993.1
Human papillomavirus type 18 K0213 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC508992.1
Human papillomavirus type 18 SW052 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC508991.1
Human papillomavirus type 18 SW044 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC508990.1
Human papillomavirus type 18 SW024 DNA complete genome	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	7857	LC508989.1
Human papillomavirus type 18 CL084 E6, E7 genes for E6 protein, E7 protein complete cds	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	803	LC540512.1
Human papillomavirus type 18 CL083 E6, E7 genes for E6 protein, E7 protein complete cds	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	803	LC540511.1
Human papillomavirus type 18 CL053 E6, E7 genes for E6 protein, E7 protein complete cds	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	803	LC540481.1
Human papillomavirus type 18 CL029 E6, E7 genes for E6 protein, E7 protein complete cds	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	803	LC540457.1
Human papillomavirus type 18 CL019 E6, E7 genes for E6 protein, E7 protein complete cds	Human papillomavirus t...	58.4	114	67%	2e-06	100.00%	803	LC540447.1

Figura 2. Resultado análisis para oligonucleótidos que amplifica Genotipo 18 (OEi18) con un porcentaje de identidad de 100%, tomado NCBI (NCBI, 2019).

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Human papillomavirus type 31 isolate InDRE 147 E6 protein (E6) gene complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	450	MK410488.1
Human papillomavirus type 31 isolate InDRE 137 E6 protein (E6) gene complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	450	MK410484.1
Human papillomavirus type 31 isolate LNS7384732_HPV31 complete genome	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	7878	LR862018.1
Human papillomavirus type 31 isolate 295 complete genome	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	7878	KX514430.1
Human papillomavirus type 31 isolate 114B complete genome	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	7803	KX514424.1
Human papillomavirus type 31 isolate NGLb128-31 E6 protein (E6) gene complete cds and E7 protein (E7) ge...	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	550	KX545349.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL16 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163568.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL15 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163567.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL14 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163566.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL13 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163565.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL12 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163564.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL10 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163562.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL09 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163561.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL08 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163560.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL07 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163559.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL06 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163558.1
Human papillomavirus type 31 isolate 31EPL05 E6 (E6), E7 (E7) and E5 (E5) genes complete cds	human papillom...	69.4	69.4	39%	8e-10	100.00%	3963	KU163557.1

Figura 3. Resultado análisis de oligonucleótido Genotipo (OEi31) con porcentaje de identidad de 100%, tomado NCBI (NCBI, 2019).

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 352_PA E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2898	2898	100%	0.0	100.00%	1569	KY565653.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 243_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2887	2887	100%	0.0	99.87%	1569	KY565642.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 353_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2881	2881	100%	0.0	99.81%	1569	KY565646.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 351_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2881	2881	100%	0.0	99.81%	1569	KY565644.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 69_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2876	2876	100%	0.0	99.75%	1569	KY565631.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 121_PA E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2870	2870	100%	0.0	99.68%	1569	KY565650.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 476_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2870	2870	100%	0.0	99.68%	1569	KY565648.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 249_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2870	2870	100%	0.0	99.68%	1569	KY565643.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 155_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2870	2870	100%	0.0	99.68%	1569	KY565641.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 400_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2865	2865	100%	0.0	99.62%	1569	KY565649.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 93_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2865	2865	100%	0.0	99.62%	1569	KY565640.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 60_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2865	2865	100%	0.0	99.62%	1569	KY565630.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 32_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2861	2861	100%	0.0	99.55%	1569	KY565629.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 473_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2809	2809	100%	0.0	98.98%	1569	KY565623.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 359_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2804	2804	100%	0.0	98.92%	1569	KY565622.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 340_PA E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2798	2798	100%	0.0	98.85%	1569	KY565627.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 161_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2776	2776	100%	0.0	98.60%	1569	KY565605.1
✓	Human papillomavirus type 45 isolate 378_RJ E6 gene, complete cds; and E7 gene, partial cds	human papilloma...	2774	2774	100%	0.0	98.60%	1568	KY565615.1

Figura 4. Resultado análisis de oligonucleótidos Genotipo 45 (OEi45) con porcentaje de identidad 100%, tomado NCBI (NCBI, 2019).

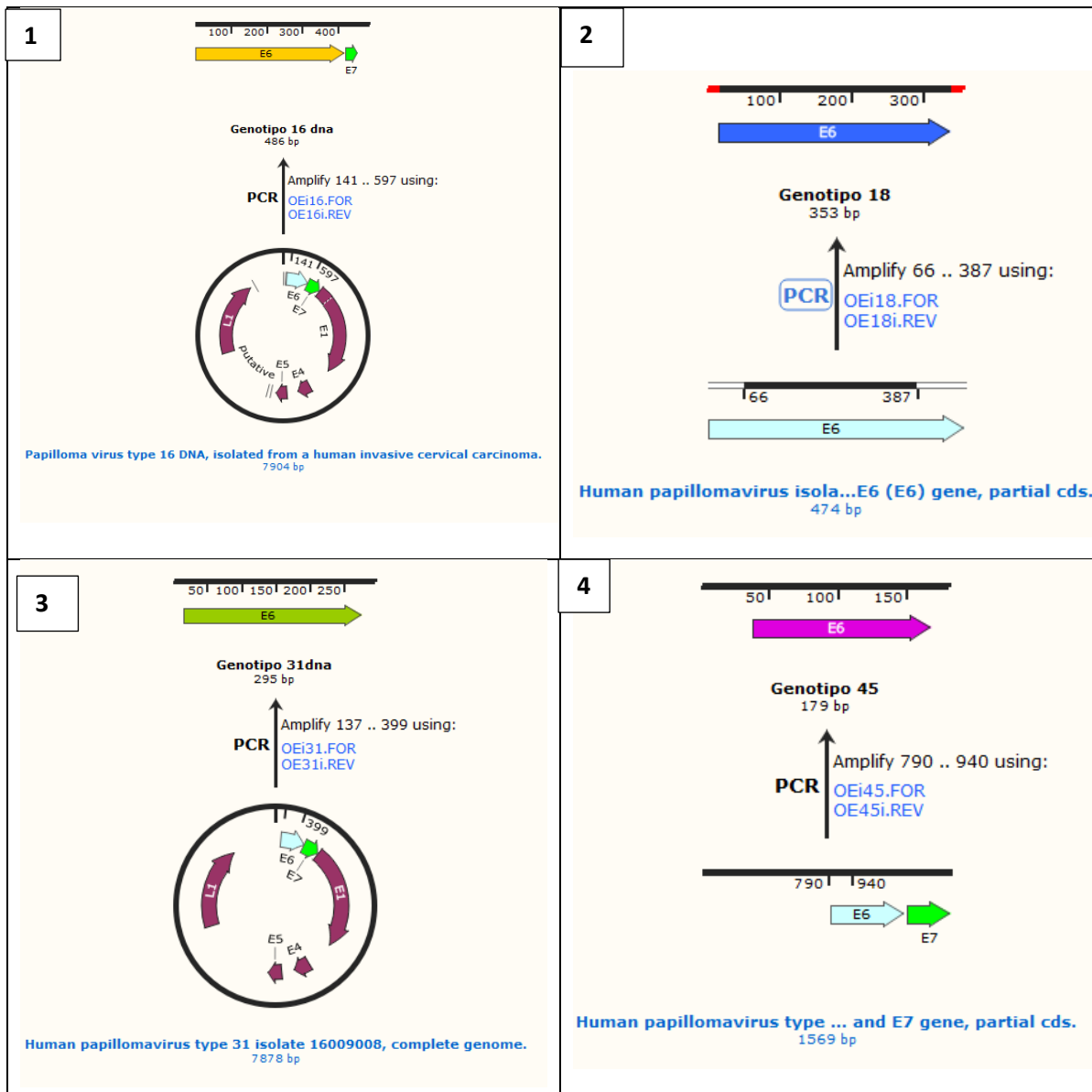
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
✓	Human papillomavirus type 59 isolate 32A_59, complete genome	human papillomavirus 59	14585	14585	100%	0.0	100.00%	7898	KU298921.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS6249536_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14563	14563	100%	0.0	99.95%	7898	LR861981.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS2917513_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14547	14547	100%	0.0	99.91%	7898	LR861860.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS0754030_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14491	14491	100%	0.0	99.78%	7898	LR861945.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS5649440_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14491	14491	100%	0.0	99.78%	7898	LR861926.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS9786324_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14486	14486	100%	0.0	99.77%	7898	LR862080.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS3929176_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14486	14486	100%	0.0	99.77%	7898	LR861889.1
✓	Human papillomavirus 59 strain kyd-s0359, complete genome	human papillomavirus 59	14480	14480	100%	0.0	99.76%	7898	MT783417.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS3271300_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14465	14465	100%	0.0	99.71%	7907	LR861866.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS3618728_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14454	14454	100%	0.0	99.68%	7907	LR861875.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS5859951_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14430	14430	100%	0.0	99.65%	7898	LR861933.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS3279856_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14425	14425	100%	0.0	99.63%	7898	LR861868.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate Qv33361, complete genome	human papillomavirus 59	14403	14403	100%	0.0	99.58%	7898	KC470266.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate Qv25808, complete genome	human papillomavirus 59	14403	14403	100%	0.0	99.58%	7898	KC470264.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS4940018_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14403	14403	100%	0.0	99.58%	7898	LR861909.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate Qv33993, complete genome	human papillomavirus 59	14392	14392	100%	0.0	99.56%	7898	KC470265.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS6048641_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14392	14392	100%	0.0	99.56%	7898	LR861974.1
✓	Human papillomavirus type 59 isolate LNS6759684_HP V59, complete genome	human papillomavirus 59	14380	14380	100%	0.0	99.53%	7898	LR861997.1

Figura 4. Resultado análisis de oligonucleótidos Genotipo 45 (OEi45) con porcentaje de identidad 100%, tomado NCBI (NCBI, 2019).

11.2 OE-PCR *in silico*

Los oligonucleótidos diseñados (**tabla 1**) a través del software SNAPGENE (SNAPGENE, 2019), nos permiten conocer un estimado del tamaño de los

amplicones los cuales corresponden con lo esperado en el presente trabajo como se muestra en la **figura 6**.



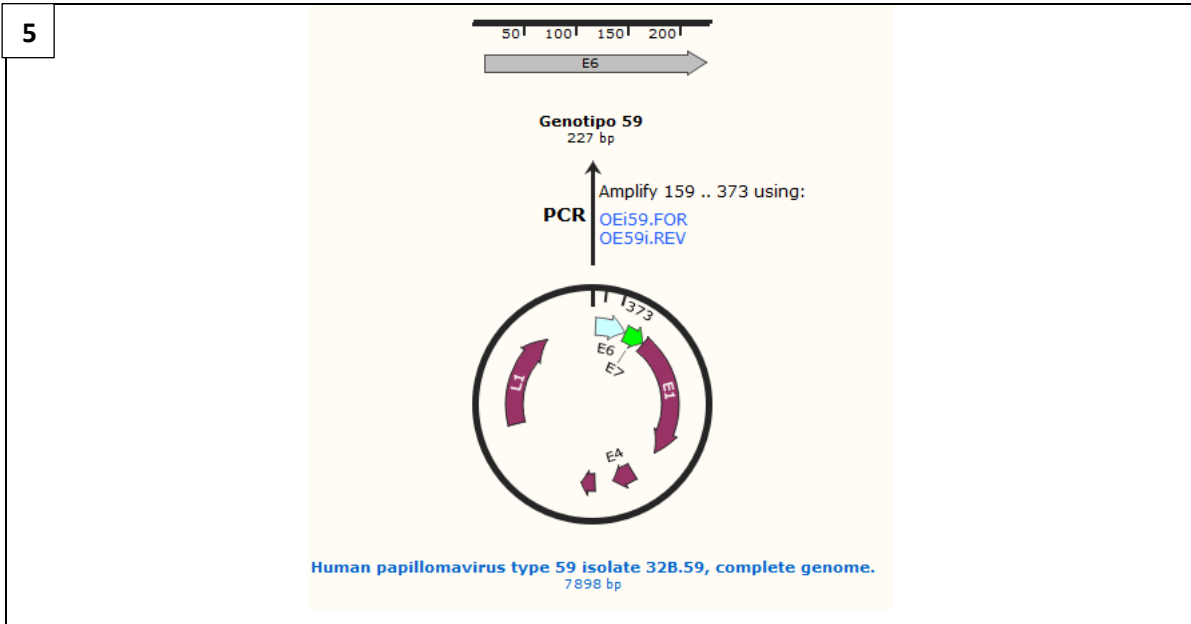


Figura 6. Amplicones obtenidos mediante PCR *in silico* de Virus de Papiloma Humano: **1)** genotipo 16 (487 pb); **2)** genotipo 18 (353 pb); **3)** genotipo 31 (295 pb); **4)** genotipo 45 (179 pb); **5)** genotipo 59 (227 pb), utilizando oligonucleótidos OE-PCR. Tomado de SnapGene (SNAPGENE, 2019).

Se diseñaron diferentes modelos de construcción de Genotipos/Plásmido, utilizando los oligonucleótidos diseñados (**tabla 1**) a fin de visualizar el multímero producto de la unión de genotipos 16, 18, 31, 45, 59 o 16, 18, 31 y 45 mediante OE-PCR, al plásmido de clonación p. Bluescript SK (+) con número de acceso (X52325) (**figura 7 y 8**), para conocer el tamaño del producto esperado. Utilizando el software SNAPGENE (SNAPGENE ,2019). Mediante los algoritmos que utiliza el software se puede predecir el resultado, sin embargo, hay limitaciones para las posibles predicciones que puede realizar, ya que muchas veces no se unen a la secuencia blanco debido a su especificidad impidiendo la amplificación de la secuencia de interés (Kalendar., *et al* 2013).

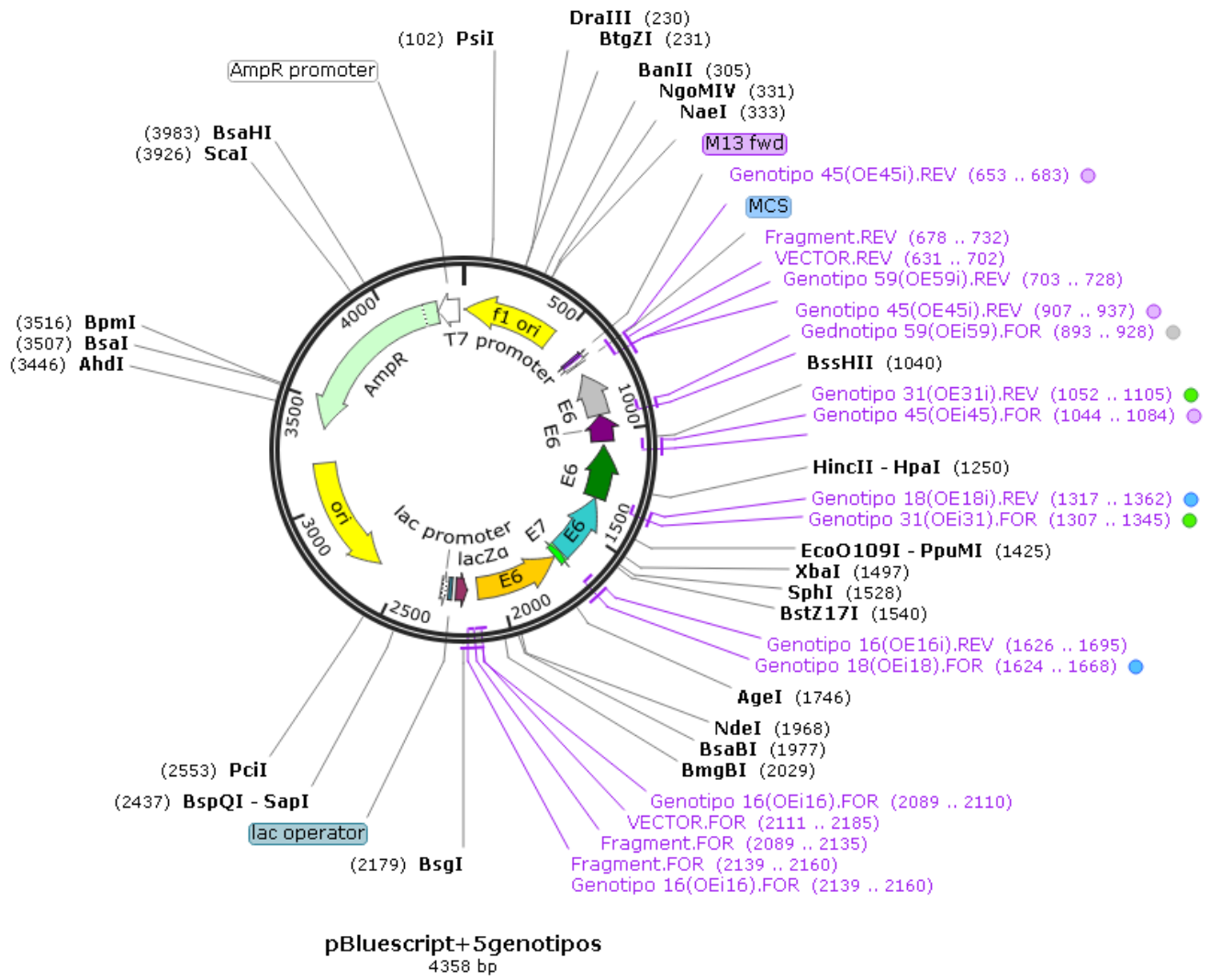


Figura 7. Construcción final producto de la unión del multímero de 5 genotipos del virus del papiloma Humano al plásmido p. Bluescript SK (+), mediante OE-PCR *in silico*. Producto final de 4358 pb (SNAPGENE 2019).

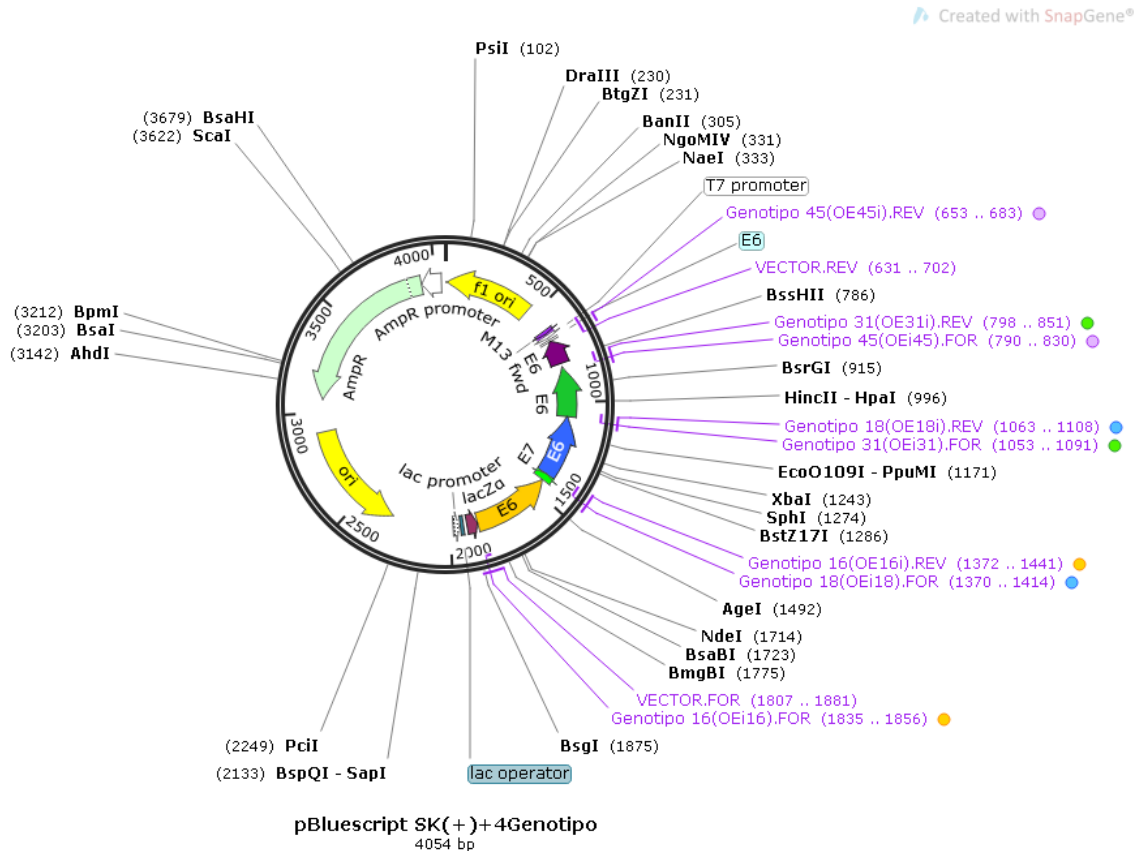


Figura 8. Construcción *in silico* de producto de unión del múltiplo de 4 genotipos de virus de papiloma humano al plásmido de clonación p. Bluescript SK +), mediante OE-PCR. Utilizando oligonucleótidos diseñados (tabla1). Producto final de 4054 pb. Tomado de SNAPGENE (SNAPGENE, 2019).

11.3 PCR con oligonucleótidos diseñados: análisis *in vitro*

11.3.1 Amplificación de genes E6/E7

La amplificación mediante una reacción en cadena múltiple Anidada (NMPCR) de la región E6/E7 resulto en un amplicon de 630 pb (Sotlar, K., *et al* 2004), obteniendo un mayor número de copias a fin de ser utilizadas posteriormente para genotipificación (figura 9).

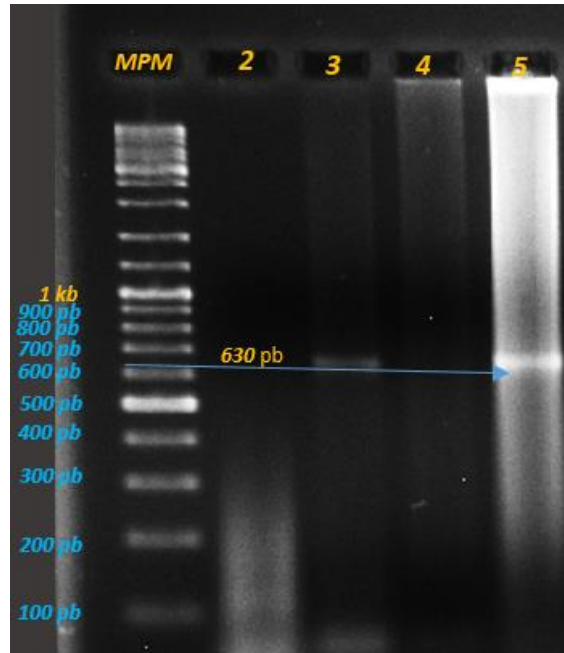


Figura 9. Electroforesis en gel agarosa 2.5%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 2: NTC (PCR E6/E7), Carril 3: Muestra, Carril 4: NTC (E6/E7), Carril 5: Muestra.

11.3.2 Amplificación de Genotipos múltiples

En la **figura 10, 11, 12 y 14** se observa en la electroforesis el producto de PCR múltiple Anidada (NMPCR); la primera (carriles 2-5) utilizando oligonucleótidos de solapamiento de los genotipo 16, 18, 31, 59 (**tabla 1**), la segunda (carriles 6-9) utilizando oligonucleótidos de genotipificación (**Anexo 2**), en ambas reacciones se utiliza el producto de Reacción en Cadena de la Polimerasa (630pb) con oligonucleótidos degenerados E6/E7 con su respectivo control negativo (carriles 3 y 7) (Sotlar, K., et al 2004).

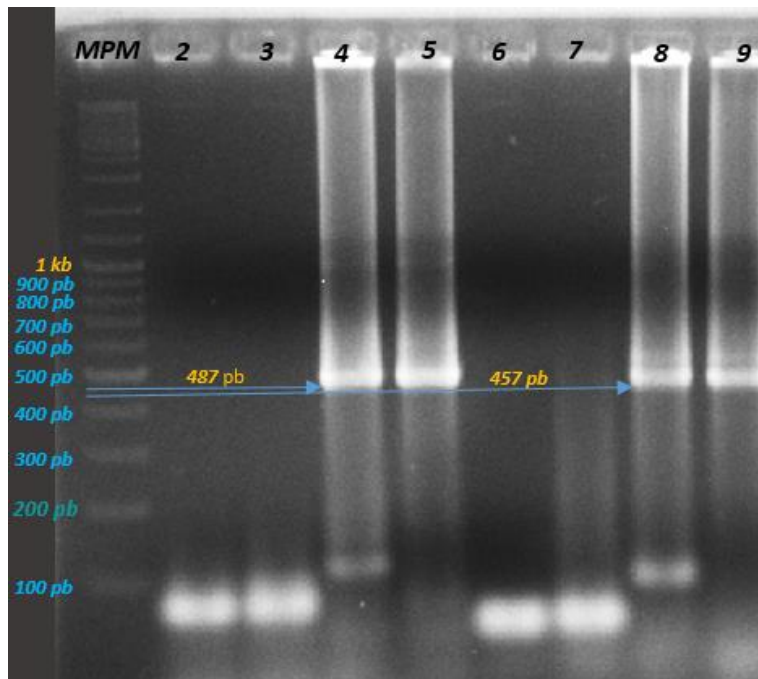


Figura 10. Electroforesis en gel agarosa 1%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 2: NTC (OE16), Carril 3: NTC (E6/E7), Carril 4: (Amplificado E6/E7), Carril 5: Control positivo*, Carril 6: NTC (VPH16), Carril 7: NTC (E6/E7), Carril 8: (Amplificado E6/E7), Carril 9: Control positivo verificado*.

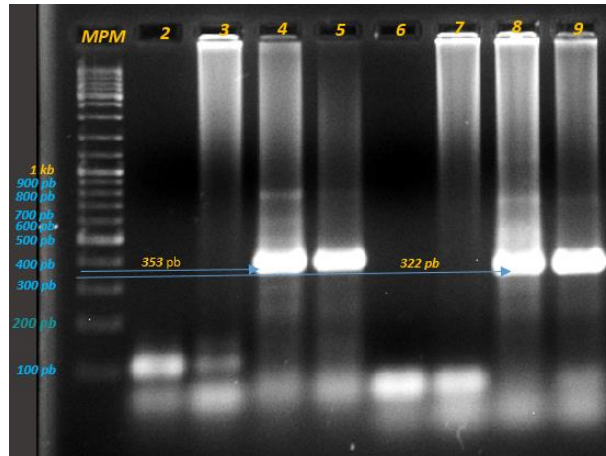


Figura 11. Electroforesis en gel agarosa 2.5%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 2: NTC (OE18), Carril 3: NTC (E6/E7), Carril 4: (Amplificado E6/E7), Carril 5: Control positivo*, Carril 6: NTC (VPH18), Carril 7: NTC (E6/E7), Carril 8: (Amplificado E6/E7), Carril 9: Control positivo verificado*.

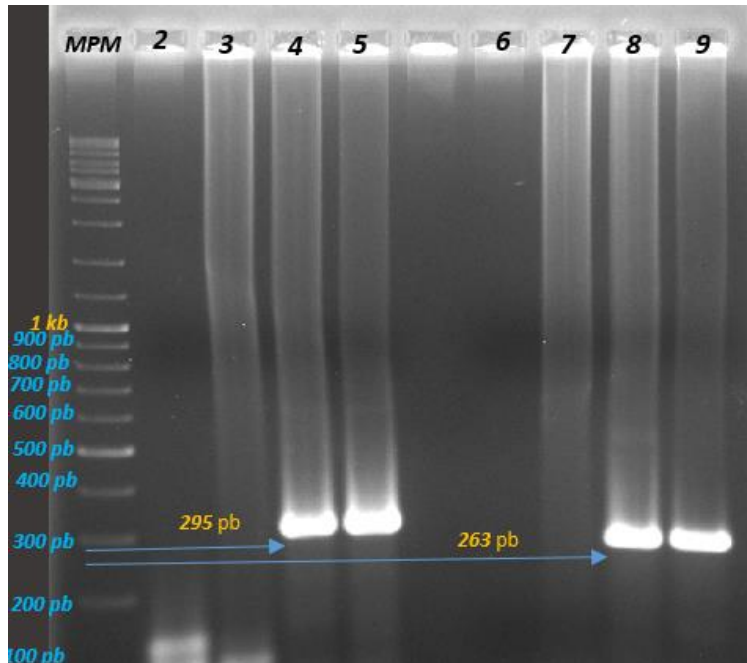


Figura 12. Electroforesis en gel agarosa 1%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 2: NTC (OE31), Carril 3: NTC (E6/E7), Carril 4: (Amplificado E6/E7), Carril 5: Control positivo*, Carril 6: NTC (VPH31), Carril 7: NTC (E6/E7), Carril 8: (Amplificado E6/E7), Carril 9: Control positivo verificado*.

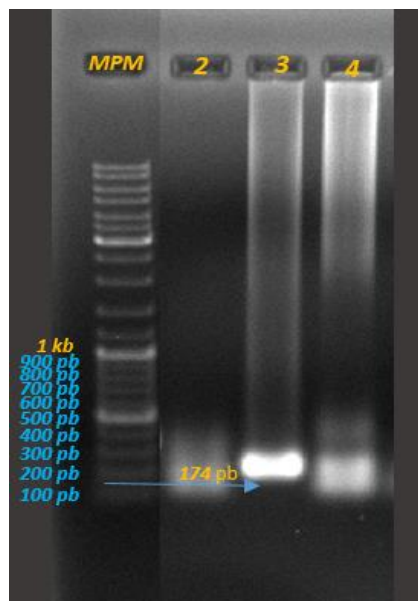


Figura 13. Electroforesis en gel agarosa 1%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 2: NTC (OE45), Carril 3: (Amplificado E6/E7), Carril 5: Control positivo verificado*.

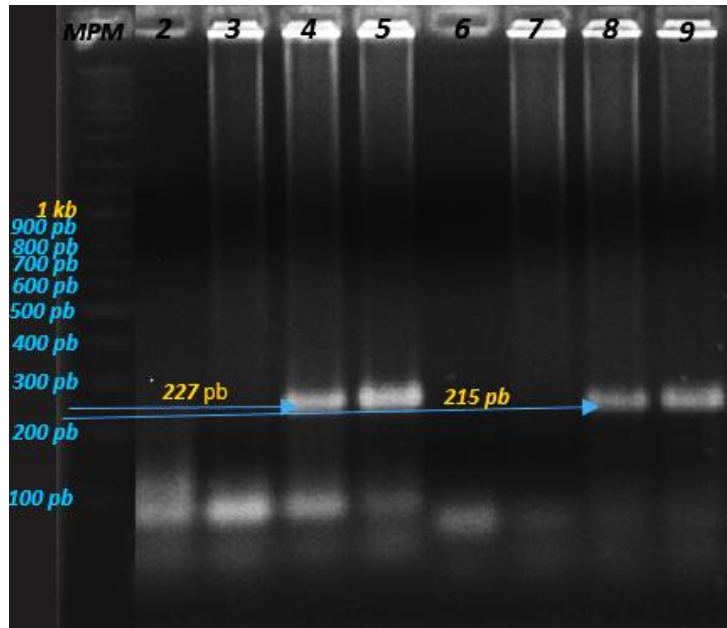


Figura 14. Electroforesis en gel agarosa 1%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 2: NTC (OE59), Carril 3: NTC (E6/E7), Carril 4: (Amplificado E6/E7), Carril 5: Control positivo*, Carril 6: NTC (VPH59), Carril 7: NTC (E6/E7), Carril 8: (Amplificado E6/E7), Carril 9: Control positivo verificado*.

La amplificación de genotipo 16 resulto en un amplicon de 487 pb (**figura 10**), el genotipo 18 resulto en un amplicon de 353 pb (**figura 11**), el genotipo 31 resulto en un amplicon de 295 pb (**figura 12**), el genotipo 45 resulto en un amplicon de 174 pb (**figura 13**), el genotipo 59 en un amplicon de 227 pb (**figura 14**), estos corresponden con lo esperado respecto a el tamaño del genotipo adicionando las secuencias complementarias para OE-PCR. Los oligonucleótidos diseñados amplificaron todos los genotipos de interés tal como en la PCR *in silico* que se muestra en la **figura 6**. El desarrollo de esta fase de la técnica PCR resulto bastante eficiente con el programa de optimización, ya que como se puede observar en la **figura 10 a 14**, se obtuvo la banda correspondiente, estos resultados concuerdan con lo reportado en trabajos de generación de mutagénesis sitio-dirigidas como el realizado por Chon You y colaboradores.

11.4 Sobrelapamiento de Extensión por Reacción en Cadena de la Polimerasa

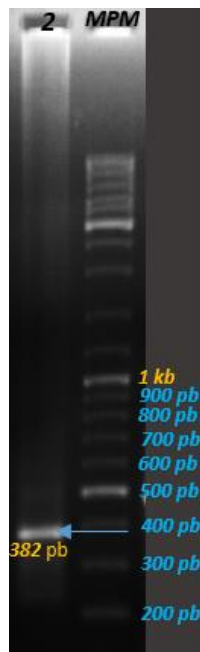


Figura 15. Electroforesis en gel agarosa 1%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 2: producto de OE-PCR fragmento 45-59 (382 pb).



Figura 16. Electroforesis en gel agarosa 1%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 3: producto de OE-PCR fragmento 31-45-59 (646 pb).

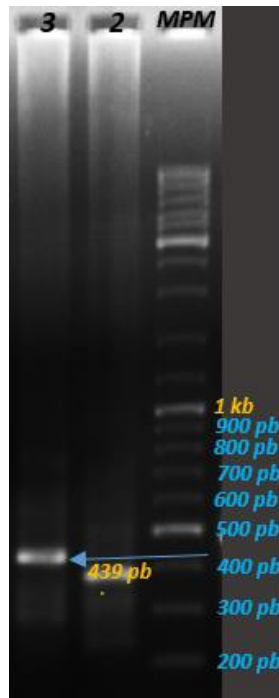


Figura 17. Electroforesis en gel agarosa 1%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 3: producto de OE-PCR fragmento 31-45 (439 pb).

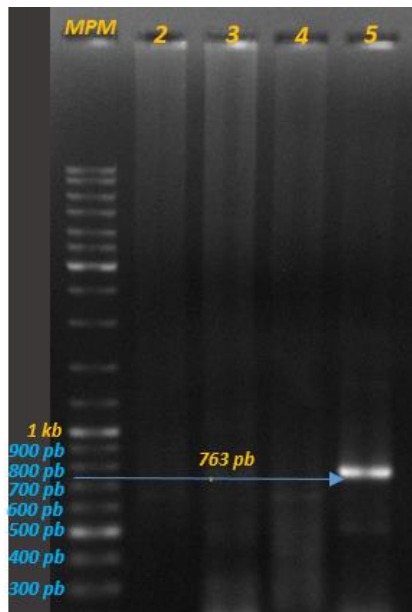


Figura 18. Electroforesis en gel agarosa 1%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 5: producto de OE-PCR fragmento 18-31-45 (763 pb).

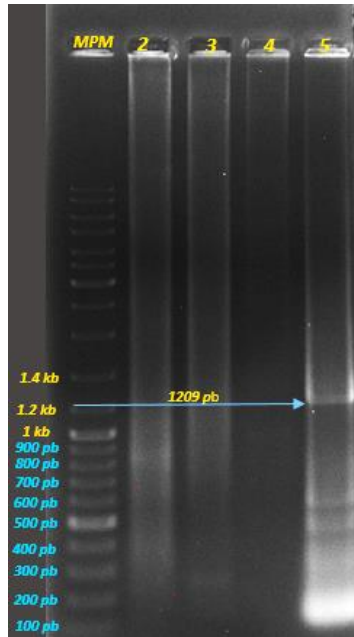


Figura 19. Electroforesis en gel agarosa 1%; Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 5: producto de OE-PCR fragmento 16-18-31-45 (1 209 pb).

Se puede observar que en la **figura 15** y **figura 16** resultado de la unión de fragmentos 45-59 (382 pb) y la adición del fragmento 31 (295 pb) respectivamente mediante OE-PCR, sin embargo, en la **figura 17**, no se adicionó el fragmento 18 como corresponde, esto debido a que no hubo sobrelapamiento del fragmento 31-45-59 (646 pb) al 18 (353 pb), a pesar de haber modificado las condiciones de sobrelapamiento (datos no mostrados) por lo que se procedió a realizar la OE-PCR solo con los fragmentos 31-45 (439 pb) adicionando el fragmento 18 (353 pb) (cabe resaltar que todos los fragmentos fueron sometidos a sobrelapamiento con su respectivo par complementario, es decir, 16-18, 18-31, 31-45, 45-59 como se muestra en **anexo 1:figura 21**) como se muestra en la **figura 18**. En la **figura 19** se muestra la unión de los fragmentos 18-31-45 (763 pb) adicionando fragmento 16 (487 pb), este último, en el oligonucleótido OE16i.REV diseñado en un inicio, se modificó, ya que a pesar de amplificar de manera individual el genotipo 16 y este correspondía el producto de PCR esperado y visualizado mediante electroforesis, al realizar OE-PCR y unirlo al fragmento 18 no se obtenía resultado alguno, a pesar de modificar las condiciones de sobrelapamiento (datos no mostrados), por lo tanto se optó por modificarlo adicionando un mayor número de pares de bases en su región 3', complementarias a la región 5' del genotipo 18. Una vez modificado se

realizó la misma evaluación que a los otros oligonucleótidos y al final se obtuvo un resultado satisfactorio, lo cual nos permite evaluar los posibles resultados que se pueden obtener mediante un software *in silico* a los resultados obtenidos *in vitro*, no obstante, esta herramienta informática sigue siendo muy útil en la posible predicción de datos obtenidos.

Con respecto al fragmento 59 (227 pb), que se unió con su respectivo par complementario que pertenecía al genotipo 45 (179 pb) (**anexo 1: figura 21**), pero no con el respectivo fragmento ensamblado que contenía a los genotipos 18-31-45, posiblemente se deba a que era necesaria la purificación de cada genotipo amplificado inicialmente antes de OE-PCR o realizar la purificación de PCR con algún kit comercial (Nelson M. D., Fitch D. H. A. 2012; Bryksin A & Matsumura I, 2013). Debido a que OE-PCR se realizó en tándem y la integridad del ADN puede verse afectada a pesar de realizar de forma consecutiva las OE-PCR evitando en lo posible los largos periodos a variaciones de temperatura y manipulación.

Un resultado importante sobre la técnica OE-PCR es la formación de multímeros de ADN, la importancia de la longitud de solapamiento entre los fragmentos de los genotipos, como se pudo observar en el oligonucleótido Reverse (OE16i.REV) del genotipo 16 , en algunos trabajos como el de Chon You y los protocolos como Bryksin & Matsumura así como los trabajos basados en OE-PCR (Van der Ent F, Löwe J. 2006; Nelson M.D, Fitch D.H.A. 2012; You C, Percival Z. 2012) los cuales recomiendan un sitio de superposición de 20 a 50 pb para los fragmentos de ADN a amplificar y que posteriormente se utilizaran como inserto para la clonación en un plásmido seleccionado. En este caso como se mostró en el **esquema 3**, el genotipo 16 (487 pb) solapa 43 pb con el genotipo 18 (353 pb), mientras que éste solapa 29 pb con el genotipo 31 (295 pb), y al mismo tiempo solapa 33 pb al genotipo 45 (179 pb) y finalmente, éste solapa 22 pb al genotipo 59 (227 pb).

Los oligonucleótidos de unión para el plásmido p. BlueScript SK(+) de clonación se diseñaron (**Anexo 2: tabla 3**) una vez obtenidos los fragmentos que si se unieron (multímero) para poder basarse en esa secuencia y utilizarla como inserto a fin de proceder a su diseño incorporando sitios de restricción (Nelson M. D., Ficht D. H. A.

2012). Por lo tanto, en un inicio los oligonucleótidos OEi16.FOR y OE59i.REV no tenían incorporados los sitios complementarios a la región 3' y 5' del plásmido p. BlueScript SK (+) del sitio de inserción.

12. PCR con control nuevo de genotipos (18-31-45) ensamblado en Tándem para detectar genotipo 31.

En la **figura 20**, se observa que el fragmento ensamblado en Tándem de los genotipos 18-31-45 (763 pb), se utilizó como control positivo para detectar el genotipo 31, el producto de 263 pb se obtuvo utilizando los oligonucleótidos de genotipificación **Anexo 1: tabla 2**. *muestra verificada para cada genotipo.

En la OE-PCR, realizada se ensamblaron fragmentos de ADN con un tamaño de 1204 pb en tándem, que contiene genotipos de alto riesgo 16, 18, 31, 45, integrando secuencias de solapamiento complementario, este resultado concuerda con lo obtenido por Chun You y colaboradores (You C, Percival Z. 2012) donde de igual manera la utilización de OE-PCR, permitió la construcción de un multímero de ADN para su posterior inserción en un plásmido de clonación. Cabe mencionar que esta técnica ha sido utilizada en su mayoría para mutagénesis sitio dirigidas en el estudio de proteínas, en este caso la técnica fue utilizada para el desarrollo de un control positivo para detección de genotipos de Virus de Papiloma Humano.

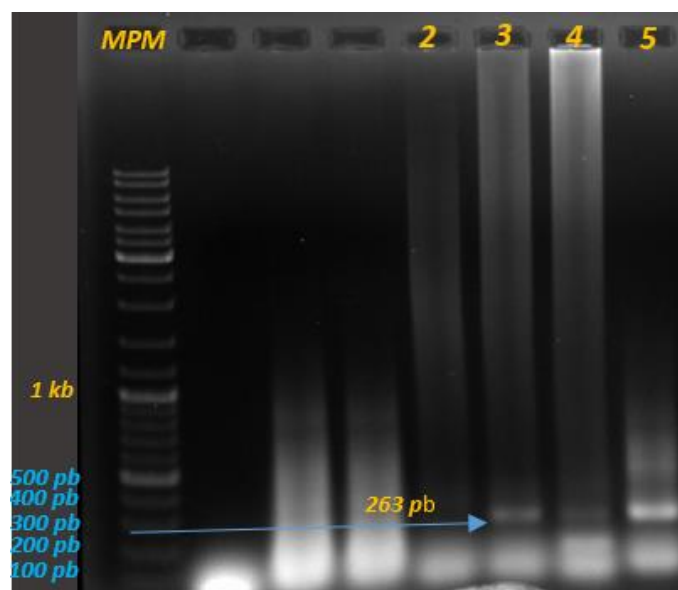


Figura 20. Electroforesis en gel de agarosa. Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 2: NTC, Carril 3: muestra (producto de 263 pb amplificado con oligonucleótidos **Anexo 1: Tabla 2**), Carril 4: Control Positivo* (producto de 263 pb amplificado con oligonucleótidos **Anexo 1: Tabla 2**), Carril 5: nuevo control fragmento de genotipos ensamblados en Tándem 18-31-45 (763pb) amplificado con oligonucleótidos **Anexo 1: tabla 2**.

13. Conclusión

Se obtuvieron oligonucleótidos diseñados para amplificar genotipos 16, 18, 31, 45, 59 de Virus del Papiloma Humano, integrando secuencias que sobrelapan con su respectivo par complementario, en la región 3' y 5' respectivamente.

Se obtuvo el programa de estandarización de OE-PCR para el ensamblaje de los fragmentos correspondientes a los genotipos de interés.

Se obtuvieron 2 fragmentos, el primero con genotipo 16-18-31-45 (1209 pb) y el segundo 31-45-59 (646 pb)

Se utilizó el fragmento ensamblado (multímero) de los genotipos 18-31-45 producto de OE-PCR como control positivo en la detección de genotipo 31.

Se obtuvo un multímero de ADN correspondiente a genotipos de Virus del Papiloma Humano de alto riesgo.

14. Perspectivas

Como perspectiva, podría realizarse una optimización para unir estos 2 fragmentos resultantes de OE-PCR, ya que cuentan con una región mayor de hibridación, a fin de formar un solo fragmento o diseñar 2 vectores de clonación para cada fragmento. Aunque es necesaria la secuenciación como prueba confirmatoria.

Un porcentaje del objetivo original se alcanzó, sin embargo, queda probar con el resto de los genotipos de interés, sin olvidar, la clonación del fragmento en un vector de clonación.

14. Bibliografía

- Acevedo, Ana María, Santana, Elaine, Díaz de Arce, Heidy, Pérez, L.J, Caballero, A, Suárez, L, & Sánchez, O. (2009). DESARROLLO DE CONTROLES POSITIVOS PARA MÉTODOS MOLECULARES DE DETECCIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA AVIAR. *Revista de Salud Animal*, 31(1), 50-54.
- Amaresh Das, Erica Spackman, Dennis Senne, Jan Pedersen, David L. Suarez (2006). Development of an Internal Positive Control for Rapid Diagnosis of Avian Influenza Virus Infections by Real-Time Reverse Transcription-PCR with Lyophilized Reagents *J Clin Microbiol*; 44(9): 3065–3073.
- BioRender (2020). Recuperado de: <https://app.biorender.com/ilustration/>
- Broutet N, O'Neal Eckert L, Ullrich A, Bloem P. (2016). Control integral del cáncer; Guía de prácticas esenciales cervicouterino. Washington, D. C: OPS. pp(8-11; 28-30).
- Bryksin A & Matsumura I. (2013) Overlap Extension PCR Cloning. In: Polizzi K., Kontoravdi C. (eds) *Synthetic Biology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*, vol 1073. Humana Press, Totowa, NJ
- Camacho D., Reyes J., Franco L., Comach G., Ferrer E. (2016). Clonación de secuencias de alfavirus y flavivirus para su uso como controles positivos en el diagnóstico molecular. *Revista peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*. 33 (2), 269-273.
- Charles W. Noah, Christine I. Shaw, Jack S. Ikeda, karen S. Kreuzer, John N. Sofos (2005). Development of Green Fluorescent Protein–Expressing Bacterial Strains and Evaluation for Potential Use as Positive Controls in Sample Analyses. *J Food Prot* 1; 68 (4): 680–686.
- Chun You, Xiao-Zhou Zhang, Y.-H. Percival Zhang. (2011). Simple Cloning via Direct Transformation of PCR Product (DNA Multimer) to *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *American society for microbiology*, DOI: 10.1128/AEM.07105-11

Cáncer Cervicouterino. Organización Mundial de la Salud. Organización panamericana de la salud. 2018.

Cáncer de la mujer. Secretaria de Salud. Cubo del Sistema Epidemiológico y Estadístico de las defunciones. 2015.

De la Fuente-Villarreal D, Guzmán-López S, Barboza-Quintana O, González-Ramírez R. A. (2010). Biología del Virus del Papiloma Humano y técnicas de diagnóstico. Elsevier, 12, 231-238.

De Guglielmo, Zoraya, Ávila, Maira, Fernandes, Andreína, Veitía, Dayahíndara, & Correnti, María. (2013). Extracción de ADN de muestras incluidas en parafina sin el uso de xilol para la detección y tipificación de VPH. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 33(1), 83-86. Recuperado en 09 de marzo de 2022, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562013000100016&lng=es&tlng=es.

Gaceta Mexicana de Oncología. 2014;13(Supl 4):4-17.

Gómez-Márquez J. (2013). La Revolución de la Ingeniería Genética. Nova Acta Científica Compostelana (Biología), 20 ,13-21

Heredia-Caballero A. G, Palacios-López G. G, Castillo-Hernández M. C. (2017). Prevalencia y tipificación de genotipos de virus del papiloma humano en mujeres del área metropolitana del valle de México. Ginecología y Obstetricia Mexicana, 85 (12), 809-818.

Instituto Nacional del Cáncer. (2020). (<https://www.cancer.gov>)

Joshi M. (2010). Polimesase Chain Reaction: methods, principles and aplicaciones. International journal of medical reseach, 5, 81-97.

Lee J., Shin MK., Ryu DK., Kim S., Ryu WS. (2010) Insertion and Deletion Mutagenesis by Overlap Extension PCR. In: Braman J. (eds) In Vitro Mutagenesis Protocols. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 634. Humana Press, Totowa, NJ.

NCBI (2020). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore>

NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

NEB (2019). <https://international.neb.com/tools-and-resources>

PROMEGA CORPORATION (2019).
<https://worldwide.promega.com/resources/tools/biomath/>

Sabater-Cabrera C., Rodríguez-Pérez M., Vázquez F. y Otero-Guerra L. (2017).
Detección de infecciones de transmisión sexual por técnicas de biología
molecular. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(3), 58-63.

Sanabría, J. (2009). Human papilloma virus (HPV). *REVISTA CIENCIAS MÉDICAS*,
Volumen 13, ISSN 1561-3194.

Snapgene (2019). Tips for overlap extensión PCR. Recuperado el 12 de enero 2020.
<https://www.snapgene.com/resources/gibson-assembly/>

Suárez Moya A, Esquivias Gómez I, Vidart Aragón & Picazo de la Garza J (2066).
Detección y tipificación mediante biología molecular del virus del papiloma
humano en muestras genitales. *Rev Esp Quimioterap*, Vol. 19 (Nº 2), 161-
166.

Sotlar, K., Diemer, D., Dethleffs, A., Hack, Y., Stubner, A., Vollmer, N., Menton, S.,
Menton, M., Dietz, K., Wallwiener, D., Kandolf, R. y Bültmann, B. (2004).
Detection and Typing of Human Papillomavirus by E6 nested Multiplex PCR.
Journal of clinical microbiology, 42 (7), 3176-3184.

Termo Fisher Scientific Web Tools (2019).
<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools.html>

THERMOFISHER SCIENTIFIC (2019). Recuperado 12 Enero 2020 de
<https://www.thermofisher.com/mx/es/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-pcr/thermo-scientific-pcr->

enzymes-master-mixes/high-fidelity-dna-polymerases-master-mixes-thermo-scientific/phusion.html

Unemo, M., Ballard, R., Ison, C., Lewis, D., Ndowa, Francis., Peeling, R. (2013). Diagnóstico de laboratorio de las infecciones de transmisión sexual, incluida la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Geneva, Switzerland. ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, OMS.

Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J., Faircloth B. C., Remm M, Steven G. Rozen, (2012) Primer3 — nuevas capacidades e interfaces, *Nucleic Acids Research*, Volumen 40, Número 15Página e115, <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>

Van der Ent F, Löwe J. (2006). RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 67, 67-74.

You C, Percival Z. (2012). Easy preparation of a large-size random gene mutagenesis library in *Escherichia coli*. *Analytical Biochemistry*, 428, 7-12.

15. Anexos

Anexo 1.

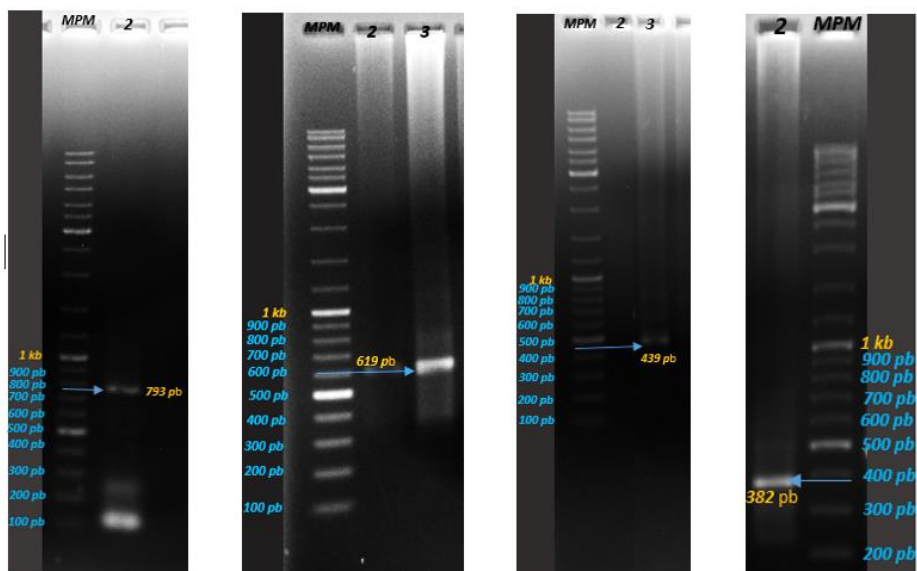


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa 1%. Teñido en bromuro de etidio y revelado en fotodocumentador (Izquierda a derecha). En primer gel de agarosa se observa en el carril 1: el marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb). Carril 2: producto OE-PCR fragmento 16-18 de 793 pb. En el segundo gel carril 1: marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb). Carril 3: producto de OE-PCR fragmento 18-31 de 619 pb. En el tercer gel carril1: marcador de peso molecular (DNA Ladder 3K), Carril 3: Producto de OE-PCR fragmento 31-45 de 439 pb. En el cuarto gel Carril 1: marcador de peso molecular (DNA Ladder 3Kb), Carril 2: producto OE-PCR fragmento 45-59 de 382 pb.

TABLA 2.Oligonucleótidos de genotipificación

Oligonucleótidos	Forware	Reverse
Genotipo 16	CACAGTTATGCACAGAGCTGC	CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA
Genotipo 18	CACTTCACTGCAAGACATAGA	GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA
Genotipo 31	GAAATTGCATGAACTAAGCTCG	CACATATACCTTTGTTTGTCAA
Genotipo 45	GTGGAAAAGTGCATTACAGG	ACCTCTGTGCGTTCCAATGT
Genotipo 59	CAAAGGGGAACTGCAAGAAAG	TATAACAGCGTATCAGCAGC

Fórmula. Utilizada en el programa Biomath para obtener pmoles de DNA

$$\mu\text{g DNA} \times \frac{\text{pmol}}{660 \text{ pg}} \times \frac{10^6 \text{ pg}}{1 \mu\text{g}} \times \frac{1}{N} = \text{pmol DNA}$$

N=es el número de nucleótidos

$\frac{660 \text{ pg}}{\text{pmol}}$ =es el numero promedio del peso molecular de un par de nucleótidos

Anexo 2

TABLA 3. Oligonucleótidos para OE-PCR fragmentos 16-45 y vector p. BlueScript SK (+).

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Tm	pb	GC%
F4.FOR	ATGATTACGCCAAGCTCGAAATTAACCTCACTAAAGGGAACAAAAGCTGCACAGTTATGCACAGAGCTGCAA	74°	73	44
F4.REV	GTA AACGACGGCCAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGTTCCCTTTGACCTCTGTGC	74°	71	48
VECTOR.FOR	TTCTAATATTATATCATGTATAGTTGTTTGACGCTCTGTGCATAACTGTGCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGG	70°	75	37
VECTOR.REV	CTGTGTATATTGCAAAGCAACATTGGAACGCACAGAGGTCAAAGGGAACCAATTCGCCCTATAGTGAGTCG	74°	72	47