



**UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO**  
**FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y**  
**BIOTECNOLOGÍA**  
**CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA**



---

**Tema:** Diseño y estandarización de un protocolo de diagnóstico molecular por RT-PCR para la genotipificación de las variantes de VPH predominantes en Ecuador  
(Genotipos:16, 18, 45, 58, 31)

---

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingeniero Biotecnólogo, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

**Autor:** Kevin Patricio Limachi Coello

**Tutor:** PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

**Ambato – Ecuador**

**Septiembre - 2023**

## **APROBACIÓN DEL TUTOR**

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

### **CERTIFICA**

Que el presente Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Trabajo de Titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencias e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 25 de julio del 2023

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís.

C.I. 1804256905

**TUTOR**

## **AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN**

Yo Kevin Patricio Limachi Coello, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente Trabajo de Titulación, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniero Biotecnólogo son absolutamente auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas



Kevin Patricio Limachi Coello

C.I: 1805012273

**AUTOR**

## **DERECHOS DE AUTOR**

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato para que haga de este Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi Trabajo de Titulación con los fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.



Kevin Patricio Limachi Coello

C.I.: 1805012273

**AUTOR**

## **APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO**

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Informe Trabajo de Titulación, modalidad de Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para Constancia firman

-----  
Presidente del tribunal

-----  
BQF. Irvin Ricardo Tubón Usca. PhD  
C.I. 0604250357

-----  
MSc. Cristian Fernando Galarza Galarza  
C.I. 1803160272

Ambato, 25 de agosto 2023

## DEDICATORIA

*A mamá Judith aquí en la tierra al amor, a los abrazos, a las lágrimas, a las noches en vela y a toda su paciencia, al afecto que siempre nos brindó al arduo trabajo de crianza que nos otorgó.*

*A papá Patricio allá en lo más alto del cielo, al ejemplo de vida que me ha dado, a los valores, al carácter que me ha forjado, al respeto, al cariño, al esfuerzo, a su memoria y su legado.*

*A mis hermanos José y Mateo, a la complicidad de vida, al apoyo, las riñas infantiles y todo el soporte que siempre me han brindado.*

*Al pequeño Kevin con la ambición de comerse y cambiar el mundo, nunca te rindas.*

*A mi familia Limachi-Moreta.*

*A la ciencia y a todo aquel que hace uso de ella para el desarrollo de un premioso mañana.*

*Kevin L.*

## AGRADECIMIENTO

*A Dios sobre toda las cosas, por darme la alegría de vivir, el placer de soñar, el intelecto para discernir, la capacidad de poder sentir, oír, hablar, ver y escuchar*

*A todos los que me siguieron en este proceso de crecimiento, a aquel que me dio una palabra de aliento, un abrazo de consuelo, un saludo sincero, a mis compañeros y amigos que compartieron este proceso académico José, Cristian, Ángela, Bryan, Anthony, Kevin, Juan y a quienes estuvieron en cruciales y no tan buenos momentos en especial a Geo, Jimmy, Paúl, Andrés, Henry y Lucho.*

*Una vez más a mamá, a papá, a mis hermanos y a toda mi familia Limachi – Moreta. A mis consejeros de vida, mi tío Ángel y mi tía Pancha, gracias por siempre cuidarme y protegerme.*

*Así mismo quiero agradecer a todo el equipo de Laboratorio de Especialidades Médicas Ochoa & Ochoa en especial al Ing. Luis Domínguez por su mentoría, conocimiento y paciencia y a la Dra. Estefanía Ochoa, por abrirme las puertas de tan magna institución*

*A la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, particularmente al laboratorio de investigación de inmunología y virología liderado por la Dra. Marbel Torres y en especial a la Ing. Andrea Aluisa, gracias por abrirme las puertas al conocimiento y la investigación.*

*A mi tutora, Dra. Lorena Núñez por guiarme en todo este importante proceso, al Dr. David Terán Mera que sembró en mí el espíritu de amor a la ciencia y la correcta filosofía de vida, al Dr. Jorge Briceño, al Dr. Mario García, al Dr. William Calero y a quien en vida fue el Dr. Carlos Rodríguez gracias por cada hora de ciencia compartida.*

*Kevin L.*

## ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN .....	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO .....	v
DEDICATORIA .....	vi
AGRADECIMIENTO.....	ii
ÍNDICE DE TABLAS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
RESUMEN EJECUTIVO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
CAPÍTULO I.....	1
MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. Antecedentes Investigativos .....	1
1.1.1. Infecciones de Transmisión Sexual (ITS).....	1
1.1.2. El Virus del Papiloma Humano (VPH).....	1
1.1.3. El VPH y el cáncer.....	9
1.1.4. Incidencia del VPH a nivel global .....	12
1.1.5. Incidencia del VPH a nivel nacional.....	13
1.1.6. Variación geográfica del VPH.....	14
1.1.7. Diagnóstico de VPH .....	15
1.1.8. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) .....	17
1.1.9. Real Time PCR (RT-PCR) .....	23
1.1.10. Prueba in house .....	26

1.1.11.	Importancia del diagnóstico molecular .....	27
1.2.	Objetivos.....	28
CAPÍTULO II .....		29
METODOLOGÍA .....		29
2.1	Materiales .....	29
2.2	Métodos .....	31
	Diseño <i>in silico</i> .....	31
2.2.1	Revisión bibliográfica.....	31
2.2.2	Bioinformática .....	31
2.2.1	Alineamientos múltiples .....	33
2.2.2.1.1	Alineamiento global.....	33
2.2.2.1.2	Alineamiento local .....	33
2.2.2	Diseño de cebadores .....	33
2.2.3	PCR <i>in silico</i> .....	34
	<i>Diseño in vitro</i> .....	35
2.2.4	Reconstitución de primers .....	35
2.2.5	Reconstitución de genes sintéticos .....	35
2.2.6	Real time-PCR (RT-PCR) .....	36
2.2.6.1	Temperatura de Annealing.....	37
2.2.6.2	Tiempo de annealing.....	38
2.2.6.3	Concentración de Primer.....	39
2.2.6.4	Número de ciclos.....	40
2.2.7	Límite de detección del protocolo .....	41
2.2.8	Electroforesis .....	42
2.2.9	Establecimiento de protocolo para la genotipificación de VPH .....	43

CAPÍTULO III.-.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	44
3.1. Revisión bibliográfica .....	44
3.2. Bioinformática.....	48
3.2.1. Base de datos .....	48
3.2.2. Alineamientos múltiples .....	50
3.2.2.1. Alineamiento global.....	50
3.2.2.2. Alineamiento local .....	52
3.2.3. Diseño de Primers.....	52
3.2.4. Especificidad.....	54
3.3. Temperatura de Annealing (Ta) .....	57
3.4. Tiempo de Annealing (ta).....	67
3.5. Concentración de Primer ([P]).....	70
3.6. Número de ciclos.....	73
3.7. Identificación del Background .....	74
3.9. Sensibilidad .....	78
3.10. Integridad de Amplicones.....	82
CAPÍTULO IV.- .....	84
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	84
4.1. Conclusiones.....	84
4.2. Recomendaciones.....	85
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXOS.....	96

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> <i>Constitución del ADN viral del VPH por genes</i> .....	4
<b>Tabla 2.</b> <i>Clasificación del VPH según el cuadro clínico-patológico</i> .....	5
<b>Tabla 3.</b> <i>Incidencia del VPH en el desarrollo del cáncer</i> .....	11
<b>Tabla 4.</b> <i>Diagnóstico convencional de VPH</i> .....	15
<b>Tabla 5.</b> <i>Características óptimas para el diseño de primers</i> .....	18
<b>Tabla 6.</b> <i>Condiciones de componentes estándar para la PCR catalizada por ADN polimerasa</i> .....	20
<b>Tabla 7.</b> <i>Etapas de la PCR</i> .....	21
<b>Tabla 8.</b> <i>Equipos de Laboratorio</i> .....	29
<b>Tabla 9.</b> <i>Reactivos de Laboratorio</i> .....	29
<b>Tabla 10.</b> <i>Materiales de Laboratorio</i> .....	30
<b>Tabla 11.</b> <i>Materiales de escritorio</i> .....	30
<b>Tabla 12.</b> <i>Código de taxón por genotipo de VPH</i> .....	32
<b>Tabla 13.</b> <i>Criterios de inclusión, genomas de VPH</i> .....	32
<b>Tabla 14.</b> <i>Características óptimas de cebadores</i> .....	33
<b>Tabla 15.</b> <i>Principales patógenos del tracto vaginal</i> .....	34
<b>Tabla 16.</b> <i>Parámetros de la PCR a evaluar</i> .....	37
<b>Tabla 17.</b> <i>Componentes de la RT-PCR para el ensayo temperatura de annealing</i> .....	38
<b>Tabla 18.</b> <i>Condiciones de amplificación de la PCR para el ensayo Temperatura de Annealing</i> .....	38
<b>Tabla 19.</b> <i>Componentes de la RT-PCR para el ensayo tiempo de annealing</i> .....	39
<b>Tabla 20.</b> <i>Condiciones de amplificación de la PCR para el ensayo Tiempo de Annealing</i> .....	39
<b>Tabla 21.</b> <i>Componentes de la RT-PCR para el ensayo concentración de primer</i> .....	40
<b>Tabla 22.</b> <i>Condiciones de amplificación de la PCR para el ensayo concentración de primer</i> .....	40
<b>Tabla 23.</b> <i>Componentes de la RT-PCR para el ensayo número de ciclos</i> .....	41
<b>Tabla 24.</b> <i>Condiciones de amplificación de la PCR para el ensayo número de ciclos</i> ..	41

<b>Tabla 25.</b> <i>Criterios para artículos de revisión</i> .....	44
<b>Tabla 26.</b> <i>Información del VPH a nivel del Ecuador</i> .....	46
<b>Tabla 27.</b> <i>Secuencias de VPH</i> .....	49
<b>Tabla 28.</b> <i>Primers diseñados para genotipificación de VPH</i> .....	54
<b>Tabla 29.</b> <i>Ta experimentales para cebadores de VPH</i> .....	57
<b>Tabla 30.</b> <i>Gradiente de temperaturas para Ta</i> .....	58
<b>Tabla 31.</b> <i>Valores de Cq para el ensayo Ta. HPV 16</i> .....	60
<b>Tabla 32.</b> <i>Valores de Cq para el ensayo Ta. HPV 58</i> .....	61
<b>Tabla 33.</b> <i>Valores de Cq para el ensayo Ta. HPV 45</i> .....	62
<b>Tabla 34.</b> <i>Valores de Cq para el ensayo Ta. VPH 18</i> .....	63
<b>Tabla 35.</b> <i>Valores de Cq para el ensayo Ta. VPH 31</i> .....	64
<b>Tabla 36.</b> <i>Valores de Cq para el ensayo de 30 segundos</i> .....	69
<b>Tabla 37.</b> <i>Valores de Cq para el ensayo de 15 segundos</i> .....	69
<b>Tabla 38.</b> <i>ta 30 segundos vs. ta 15 segundos.</i> .....	69
<b>Tabla 39.</b> <i>Valores de Cq para la concentración de primer 0.1X</i> .....	72
<b>Tabla 40.</b> <i>Valores de Cq para la concentración de primer 0.5X</i> .....	72
<b>Tabla 41.</b> <i>Valores de Cq para la concentración de primer 1x</i> .....	72
<b>Tabla 42.</b> <i>Valor promedio de Cq para cada concentración de primer</i> .....	73
<b>Tabla 43.</b> <i>Componentes de la RT-PCR para el protocolo de Genotipificación de VPH77</i>	
<b>Tabla 44.</b> <i>Programa de termociclado para el protocolo de Genotipificación de VPH</i> .77	
<b>Tabla 45.</b> <i>Diluciones para cada control de VPH</i> .....	78
<b>Tabla 46.</b> <i>Curvas de Amplificación para las Diluciones de VPH</i> .....	79
<b>Tabla 47.</b> <i>Límite de detección del protocolo de genotipificación</i> .....	80

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> <i>Relación Evolutiva entre Virus del Papiloma Humano</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> <i>Representación esquemática del genoma del VPH 16</i> .....	4
<b>Figura 3.</b> <i>Organización del ciclo de vida del VPH</i> .....	8

<b>Figura 4.</b> <i>Patogénesis de los VPH oncogénicos</i> .....	10
<b>Figura 5.</b> <i>Clasificación de las pruebas moleculares para la detección de VPH</i> .....	16
<b>Figura 6.</b> <i>Etapas de un ciclo de PCR</i> .....	22
<b>Figura 7.</b> <i>Métodos para reporte de fluorescencia</i> .....	24
<b>Figura 8.</b> <i>Curva de amplificación por RT-PCR</i> .....	25
<b>Figura 9.</b> <i>Parámetros de la Real Time - PCR</i> .....	26
<b>Figura 10.</b> <i>Diagrama de flujo experimental de los parámetros para RT-PCR</i> .....	36
<b>Figura 11.</b> <i>Diluciones de los controles positivos de VPH</i> .....	42
<b>Figura 12.</b> <i>Electroforesis en gel de amplicones de VPH</i> .....	43
<b>Figura 13.</b> <i>Infecciones por genotipo de VPH en América del Sur</i> .....	48
<b>Figura 14.</b> <i>Alineamiento global múltiple de secuencias consenso de VPH</i> .....	50
<b>Figura 15.</b> <i>Alineamiento global para secuencias de HPV 16</i> .....	51
<b>Figura 16.</b> <i>Alineamiento global para secuencias de HPV 18</i> .....	51
<b>Figura 17.</b> <i>Alineamiento global para secuencias de HPV 45</i> .....	51
<b>Figura 18.</b> <i>Alineamiento global para secuencias de HPV 58</i> .....	51
<b>Figura 19.</b> <i>Alineamiento global para secuencias de HPV 31</i> .....	51
<b>Figura 20.</b> <i>Alineamiento local para secuencias de gen L1 HPV 16</i> .....	53
<b>Figura 21.</b> <i>Alineamiento local para secuencias de gen L1 HPV 18</i> .....	53
<b>Figura 22.</b> <i>Alineamiento local para secuencias de gen L1 HPV 45</i> .....	53
<b>Figura 23.</b> <i>Alineamiento local para secuencias de gen L1 HPV 58</i> .....	53
<b>Figura 24.</b> <i>Alineamiento local para secuencias de gen L1 HPV 31</i> .....	53
<b>Figura 25.</b> <i>Reporte de especificidad de los cebadores para VPH Tipo 16</i> .....	55
<b>Figura 26.</b> <i>Reporte de especificidad de los cebadores para VPH Tipo 18</i> .....	55
<b>Figura 27.</b> <i>Reporte de especificidad de los cebadores para VPH Tipo 45</i> .....	55
<b>Figura 28.</b> <i>Reporte de especificidad de los cebadores para VPH Tipo 58</i> .....	55
<b>Figura 29.</b> <i>Reporte de especificidad de los cebadores para VPH Tipo 31</i> .....	55
<b>Figura 30.</b> <i>PCR in silico VPH Tipo 16</i> .....	56
<b>Figura 31.</b> <i>PCR in silico VPH Tipo 18</i> .....	56
<b>Figura 32.</b> <i>PCR in silico VPH Tipo 45</i> .....	56
<b>Figura 33.</b> <i>PCR in silico VPH Tipo 58</i> .....	56
<b>Figura 34.</b> <i>PCR in silico VPH Tipo 31</i> .....	56

<b>Figura 35.</b> <i>Placa de 96 pocillos para Ta</i> .....	58
<b>Figura 36.</b> <i>Curvas de amplificación Ensayo Ta, VPH 16</i> .....	60
<b>Figura 37.</b> <i>Curvas de amplificación Ensayo Ta, VPH 58</i> .....	61
<b>Figura 38.</b> <i>Curvas de amplificación Ensayo Ta, VPH 45</i> .....	62
<b>Figura 39.</b> <i>Curvas de amplificación Ensayo Ta, VPH 18</i> .....	63
<b>Figura 40.</b> <i>Curvas de amplificación Ensayo Ta, VPH 31</i> .....	64
<b>Figura 41.</b> <i>Mapa de calor para la temperatura de annealing del VPH</i> .....	66
<b>Figura 42.</b> <i>Curvas de amplificación para el ensayo tiempo de annealing (ta) del VPH</i> 68	
<b>Figura 43.</b> <i>Curvas de amplificación para el ensayo concentración de primer</i> .....	71
<b>Figura 44.</b> <i>Esquema para la disposición de muestras del background</i> .....	74
<b>Figura 45.</b> Programa 1 Background. ....	75
<b>Figura 46.</b> Programa 2 Background. ....	75
<b>Figura 47.</b> Programa 3 Background. ....	75
<b>Figura 48.</b> Diluciones VPH 16.....	79
<b>Figura 49.</b> Diluciones VPH 58.....	79
<b>Figura 50.</b> Diluciones VPH 31 .....	79
<b>Figura 51.</b> Diluciones VPH 18.....	79
<b>Figura 52.</b> Diluciones VPH 45.....	79
<b>Figura 53</b> Curvas de Melting VPH 16. ....	81
<b>Figura 54.</b> Curvas de Melting VPH 58 .....	81
<b>Figura 55.</b> Curvas de Melting VPH 31 .....	81
<b>Figura 56.</b> Curvas de Melting VPH 18 .....	81
<b>Figura 57.</b> Curvas de Melting VPH 45 .....	81
<b>Figura 58.</b> <i>Electroforesis de Amplicones Gen L1 VPH Genotipos 16, 58, 45, 18</i> .....	83

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> <i>Análisis de dímeros Primer F/R HPV 16</i> .....	96
<b>Anexo 2.</b> <i>Análisis de dímeros Primer F/R HPV 18</i> .....	96
<b>Anexo 3.</b> <i>Análisis de dímeros Primer F/R HPV 31</i> .....	97
<b>Anexo 4.</b> <i>Análisis de dímeros Primer F/R HPV 45</i> .....	97

<b>Anexo 5.</b> <i>Análisis de dímeros Primer F/R HPV 58</i> .....	98
<b>Anexo 6.</b> <i>Ensayo de comprobación de reactivos</i> .....	99

## RESUMEN EJECUTIVO

El Virus del Papiloma Humano (VPH) es el patógeno de transmisión sexual de mayor incidencia a nivel mundial, actualmente, existen más de 200 genotipos de VPH que se clasifican en cepas de bajo (BR-VPH) y alto riesgo de VPH (AR-VPH). Este último grupo es precursor de cáncer cervicouterino, el cual representa el cuarto tipo de cáncer más mortífero a nivel mundial y segunda causa de muerte de mujeres en el Ecuador. El diagnóstico temprano y específico conlleva una mejora de la calidad de vida de quienes lo padecen, bajas tasas de mortalidad y un tratamiento eficiente.

Este estudio se basó en el desarrollo de un protocolo por Real Time PCR (RT-PCR) para la genotipificación de variantes de AR-VPH que inciden en el Ecuador (16, 18, 45, 58 y 31). Las cuales fueron escogidas mediante análisis bibliográfico de investigaciones y estudios clínico-poblacionales realizados en el Ecuador en los últimos 8 años. Se desarrolló el análisis bioinformático de genomas de VPH, dando como resultado un set de 10 cebadores con la capacidad de identificar los genotipos mencionados mediante tecnología SYBR Green; además de un protocolo de termociclado para la amplificación por RT-PCR estandarizado experimentalmente en una prueba *in house* para el Laboratorio de Especialidades Médicas Ochoa & Ochoa.

Finalmente se obtuvo un protocolo capaz de identificar los genotipos de VPH 16, 18, 45, 58 y 31 con una sensibilidad de ADN sintético de 0.05 picogramos sobre microlitro. Este estudio podría escalarse como prototipo de genotipificación a probarse en muestras clínicas humanas.

**Palabras clave:** Virus del papiloma humano, cáncer cervicouterino, diagnóstico molecular, VPH, AR-VPH, BR-VPH, RT-PCR, PCR, SYBR Green, LABORATORIO DE ESPECIALIDADES MÉDICAS OCHOA & OCHOA.

## ABSTRACT

Human papillomavirus (HPV) is the most common sexually transmitted pathogen worldwide. Nowadays, there are more than 200 HPV genotypes, which are divided into low-risk (LR-HPV) and high-risk HPV strains (HR-HPV). The HR-HPV group is a precursor to cervical cancer, which is the fourth deadliest cancer worldwide and the second leading cause of death in women in Ecuador. Early and specific diagnosis leads to an improvement in quality of life, a low mortality rate, and helps in the choice of effective treatment.

This study was based on the development of a Real Time PCR (RT-PCR) protocol for the genotyping of HR-HPV variants found in Ecuador (16, 18, 45, 58, and 31), selected through a bibliographic analysis of clinical-population studies and research carried out in Ecuador in the last 8 years. A bioinformatic analysis of HPV genomes was developed, resulting in a set of ten primers that can be used to identify the above genotypes using SYBR Green technology. In addition, a thermal cycling protocol for RT-PCR amplification was standardized to develop an in-house test for Laboratory of Medical Specialties Ochoa & Ochoa.

In conclusion, we had developed a protocol that can detect HPV genotypes 16, 18, 45, 58, and 31 with a minimal synthetic DNA amount of 0.05 picograms per microliter. This study could be used as a prototype for genotyping to be evaluated in human clinical samples.

**Key words:** Human papillomavirus, cervical cancer, molecular diagnostics, Ecuador. HPV, HR-HPV, LR-HPV, RT-PCR, PCR, SYBR Green, Laboratory of Medical Specialties Ochoa & Ochoa.

## **CAPÍTULO I**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **1.1. Antecedentes Investigativos**

##### **1.1.1. Infecciones de Transmisión Sexual (ITS)**

La mayoría de ITS son asintomáticas y pueden dar lugar a consecuencias como enfermedades cardiovasculares, neurológicas, infertilidad, muerte prenatal e incluso el cáncer (OMS, 2023).

Existen más de 30 bacterias, virus y parásitos que se pueden transmitir por contacto sexual, de los cuales ocho son de mayor incidencia entre ellos; la sífilis, gonorrea, clamidiasis y tricomoniasis. Estos cuatro son curables mediante antibióticos, mientras que las infecciones del virus de la hepatitis B, herpes simple (VHS), inmunodeficiencia humana (VIH), y el papiloma humano (VPH) no tienen cura (OMS, 2021a).

Según las últimas estadísticas de la **Organización Mundial de la Salud (OMS) (2021)**, se ha determinado que cada día un millón de personas adquiere una ITS. Además, se estima que anualmente 374 millones de personas contraen una ITS curable. Más de 500 millones de personas poseen una infección por VHS y más de 311 mil muertes por cáncer de cuello uterino asociada a infecciones por VPH (OMS, 2021b).

##### **1.1.2. El Virus del Papiloma Humano (VPH)**

###### **1.1.2.1. Primeras variantes**

El VPH fue observado por primera vez en 1950 mediante imágenes de microscopía electrónica, y no fue hasta 1982 que se empezaron a identificar las primeros cepas, empezando por el VPH1, VPH2 y sus consecuentes variantes. La clasificación por

genotipos se llevó a cabo mediante ensayos de hibridación y restricción en donde, al no coincidir con las variantes ya catalogadas, se decidió atribuirles la clasificación de subtipos de acuerdo con las diferencias a nivel genómico (Ochoa-Carrillo, 2014).

En 1983 se aísla al VPH 16 y VPH 18 a partir de muestras de lesiones cervicales y se cataloga a estas variantes como principales causantes del cáncer de cuello uterino con una prevalencia del 60 y 70 por ciento respectivamente (Ochoa-Carrillo, 2014). En el año 2014 se llevó a cabo un estudio filogenético del gen L1 del virus del papiloma humano y se encontró 202 variantes (Bzhalava et al., 2015).

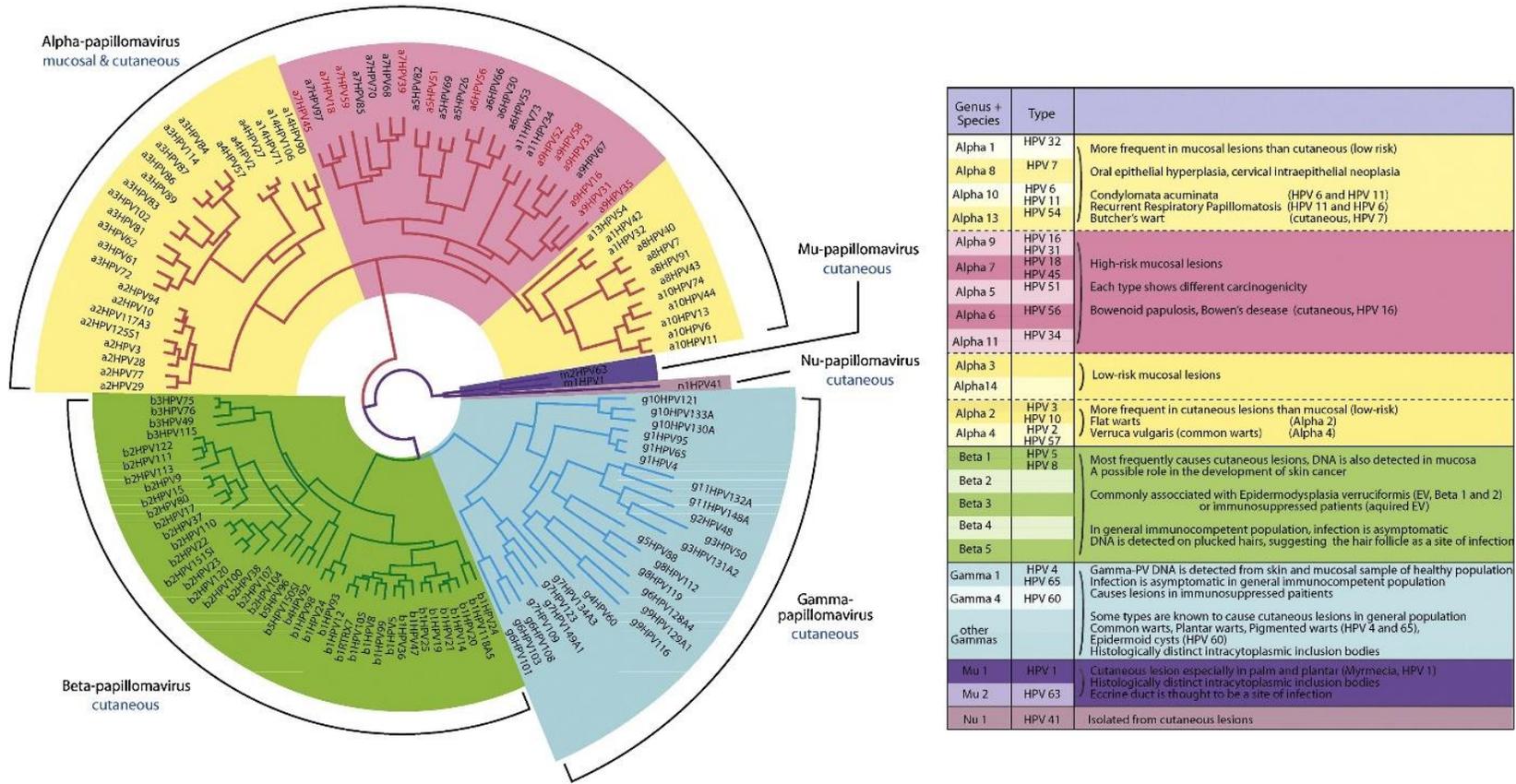
Acorde al estudio de Brancaccio et al., (2019) del gen L1, es posible clasificar al VPH en cinco grandes géneros: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus* y otros dos nuevos géneros denominados *Mupapillomavirus* y *Nupapillomavirus* que se evidencia en la **Figura 1**.

#### **1.1.2.2. Características genéticas**

El Virus del papiloma humano es un virión de ácido desoxirribonucleico (ADN) pertenecientes a la familia *Papillomaviridae*, carecen de envoltura y poseen un diámetro entre 52-55 nm. Dentro de sus características genéticas, este virus posee ADN circular de doble cadena de 8000 pares de bases (pb) de extensión distribuidos en ocho genes en tres regiones diferentes (**Figura 2**). (Prado et al., 2021). La región Early (E) donde se ubican los genes E1, E2, E3, E4, E5, E6 y E7 responsables de la transactivación de la transcripción, transformación, replicación y la adaptación viral al entorno (**Tabla 1**) (Burk et al., 2009). La Región Late (L) que está provista de los genes que codifican las secuencias encargadas de la producción de proteínas estructurales y de la cápside, genes L1 y L2 (**Tabla 1**) (Atta ur Rahman, 2016). y la **Región de regulación (URR/LCR)** donde se encuentran las secuencias que se encargan de la función regulatoria del ciclo de vida e infección del VPH (**Tabla 1**) (Burk et al., 2009).

**Figura 1.**

*Relación Evolutiva entre Virus del Papiloma Humano*



**Nota.** El VPH se divide en cinco géneros Alphapapillomavirus (Amarillo) Betapapillomavirus (Verde) Gammapapillomavirus (Celeste) Mupapillomavirus (Violeta) Nupapillomavirus (Marrón). Adaptado de: *“The low-risk papillomaviruses”* (Egawa & Doorbar, 2017).

**Tabla 1.**

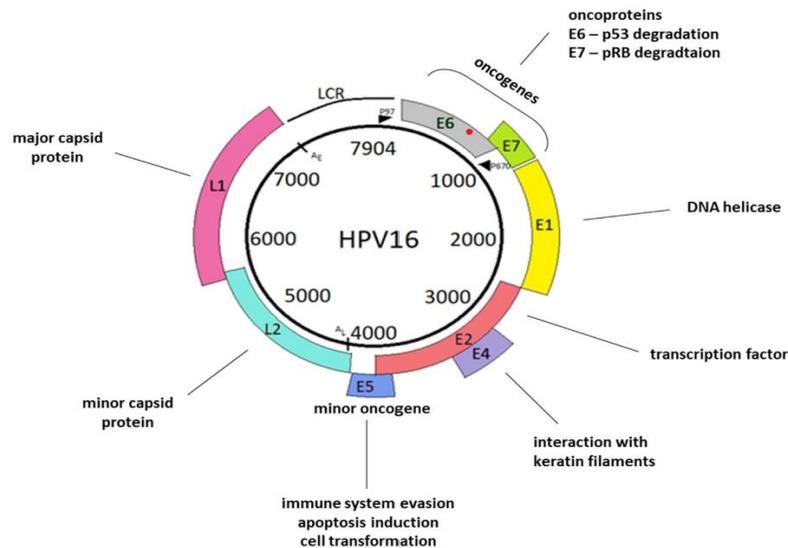
*Constitución del ADN viral del VPH por genes*

<b>Región E</b>	
<b>E1:</b> Replicación y transcripción del ADN viral	<b>E6:</b> Degradación de p53, alteración de la regulación del ciclo celular, inestabilidad de la resistencia a la apoptosis cromosómica, inmortalización celular (TERT)
<b>E2:</b> Replicación de ADN viral, apoptosis, represor transcripcional de E6/E7	<b>E7:</b> Degradación de pRB, entrada en la celular de fase S, realización y sobreexpresión de p16, inestabilidad cromosómica
<b>E4:</b> Replicación ADN viral	
<b>E5:</b> Proliferación celular, alteración de los patrones de señalización (EGFR), reconocimiento inmune (CHM) y apoptosis	
<b>Región L</b>	<b>Región URR/LCR</b>
<b>L1:</b> Proteína de la cápside mayor	<b>URR:</b> Origen de replicación, sitios de unión al factor de transcripción y control de la expresión génica
<b>L2:</b> Proteína de la cápside menor	

**Nota.** Adaptado de: “La historia natural de la infección por papilomavirus” (de Sanjosé et al., 2018).

**Figura 2.**

*Representación esquemática del genoma del VPH 16*



**Nota.** Adaptado de “Human Papillomaviruses as Infectious Agents in Gynecological Cancers. Oncogenic Properties of Viral Proteins” (Hareža et al., 2022).

### 1.1.2.3. Genotipos

Se consideran los criterios genéticos y huésped para la clasificación de papilomavirus (VPs). La clasificación según su hospedero identifica los VPs de acuerdo con el organismo que parasita, mientras que la genética se basa en la secuencia del gen L1, en donde se analizan diferencias y similitudes entre nucleótidos. Si la variación entre una secuencia con respecto a otras es >10% se considera un nuevo genotipo, si se encuentra entre 2- 10% se considera subtipo viral y si la diferencia es <2% se definen como variantes virales. (Núñez-Troconis, 2022).

En el caso de los papilomas que afectan al humano (VPHs), según el **Instituto Nacional del Cáncer (2021)**, hasta la actualidad se han identificado más de 200 genotipos de VPH. Así lo evidencia el Centro de Referencia Internacional del VPH de la Universidad de Karolinska (**Karolinska Institute, 2022**). institución que dirige su investigación a la vigilancia de los nuevos genotipos de este virus, en cuyo portal web se exponen 229 de ellos hasta el momento.

Según la capacidad oncogénica y el nivel de lesión que se produce durante la infección de este virus (Núñez-Troconis, 2022) se ha encontrado la necesidad de clasificar al VPH de acuerdo con el cuadro clínico-patológico, (Prado et al., 2021), que se describen en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Clasificación del VPH según el cuadro clínico-patológico

Grupo clínico - patológico	Tipos virales	Lesión producida
Cutáneo	1, 4	Verrugas plantares
	2, 26, 28, 29, 38, 49, 57, 60, 63, 65	Verrugas vulgares
	3, 10, 27	Verruga plana
	7	Condiloma Butcher
Epidermodisplasia verruciforme	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 10, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 46, 47, 48, 49, 50	Lesiones maculares
	12, 32	Hiperplasia epitelial focal

Grupo clínico - patológico	Tipos virales	Lesión producida
Mucoso	6, 11	LIEBG, condiloma acuminado, papiloma laríngeo y conjuntival
	42, 43, 44, 53, 54, 55, 62, 66	Principalmente LIEBG
	16, 31, 33, 35, 52, 58, 67	LIEBG, LIEAG, carcinoma escamoso invasor
	18, 39, 45, 59, 68	LIEBG, LIEAG, carcinoma a escamoso glandular

**Nota. LIEBG:** Lesión intraepitelial de bajo grado **LIEAG:** Lesión intraepitelial de alto grado. Adaptado de “*VPH Generalidades, prevención y vacunación*” (Prado et al., 2021)

Basado en el tipo de lesión intraepitelial producida y el riesgo del desarrollo del cáncer (Núñez-Troconis, 2022), los *Alphapapillomavirus* son frecuentemente clasificados en dos grupos generales, genotipos de alto riesgo (AR-VPH) y genotipos de bajo riesgo (BR-VPH) (Egawa & Doorbar, 2017).

En la **Figura 1.** se puede observar la clasificación de este género en genotipos de bajo riesgo cutáneo y mucoso BR-VPH (amarillo) y alto riesgo AR-VPH (rosa) según su asociación con el cáncer. Los genotipos color rojo han sido confirmados como carcinógenos humanos basados en el compendio de datos epidemiológicos de **Egawa & Doorbar, (2017)**, los genotipos de alto riesgo restantes en la sección rosa han sido catalogados como posibles o probables carcinógenos (**Egawa & Doorbar, 2017**).

#### **1.1.2.3.1. Genotipos de Bajo Riesgo**

Los BR-VPH son un grupo de virus que infectan mucosas, el revestimiento de órganos y cavidades corporales, se caracterizan por ser causales del apareamiento de verrugas en zonas genitales, tracto respiratorio, ano o boca. Este tipo de verrugas raramente causan cáncer y llegan a desaparecer por sí solas sin tratamiento (**National Cancer Institute, 2022**).

Los BR-VPH más comunes son el genotipo 6 y 11, además, son considerados como parte de este grupo a los genotipos 26, 40, 42, 43, 44, 53, 54, 55, 61, 62, 64, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84 (Serretiello et al., 2023) y según Moeinzadeh et al., (2020) también incluye los genotipos 43, 44, 70.

#### **1.1.2.3.2. Genotipos de Alto Riesgo**

Los AR-VPH y BR-VPH infectan el mismo tipo de células, sin embargo, el grupo de los AR-VPH es caracterizado por ser el más agresivo ya que poseen la capacidad de desarrollar lesiones intraepiteliales de alto grado, carcinomas celulares escamosos y adenocarcinomas (Moeinzadeh et al., 2020).

Los AR-VPH con mayor incidencia en cáncer son los genotipos 16 y 18, no obstante, existen otros genotipos con alta probabilidad de incurrir en carcinomas como 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 70 (Burd, 2003), Zhi et al., (2022) adicionan los genotipos 42, 44, 53 y Moeinzadeh et al., (2020) agregan a las variantes 73 y 82 como parte de este grupo.

#### **1.1.2.4. Ciclo de vida del VPH**

La infección del virus del VPH inicia en la capa basal del epitelio, ubicada antes de la membrana de la dermis, las abrasiones, microtraumas y lesiones dérmicas ayudan a la infección (Brendle et al., 2014). Los componentes específicos de membrana, como el receptor  $\alpha_6$ -Integrina (Burd, 2003), proteoglicanos de heparán sulfato, anexina A2, ciclofilinas y laminina 332 (Brendle et al., 2014) son mediadores de la entrada del virus por endocitosis (Longworth & Laimins, 2004).

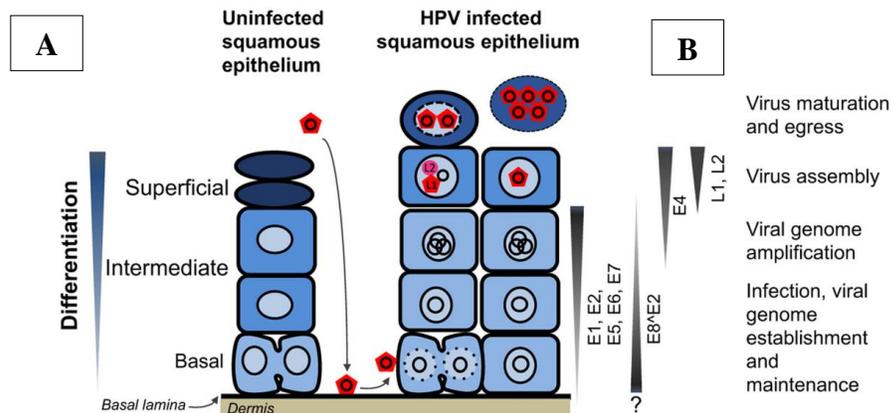
La producción de partículas de virión y el desarrollo del virus del VPH está vinculado al programa de diferenciación de los queratinocitos hasta niveles supra basales (Longworth & Laimins, 2004). Una vez dentro de la célula hospedera, la replicación del ADN viral es considerada improductiva, el promotor temprano da paso a la expresión de la helicasa

viral E1 y las proteínas E2 que en conjunto con la polimerasa  $\alpha$ -primasa del hospedero, topoisomerasa I y la proteína de replicación A, facilita la replicación temprana del ADN en episomas (**Figura 3**) (**Burley et al., 2020**).

A medida que avanza la diferenciación celular, la fase productiva del virus se activa, mientras que las proteínas de replicación viral E1 y E2 aumentan su actividad a millones de copias de ADN viral por celda; los promotores tardíos ayudan a expresar las proteínas de los genes E4, E5, L1 y L2. La función de los dos primeros aún no ha sido descrita con exactitud, sin embargo, su papel en la constitución del virión es importante. Posteriormente en la capa supra basal, los genes L1 y L2, responsables de la formación de la cápside inmunogénica, dan paso al ensamblaje y la liberación del virus en los estratos diferenciados (**Figura 3**) (**Mac & Moody, 2020**).

**Figura 3.**

*Organización del ciclo de vida del VPH*



**Nota.** A) Epitelio escamoso sin infección por VPH, B) Epitelio infectado por VPH y ciclo de vida desde el estrato basal. Adaptado de: “*Epigenetic regulation of human papillomavirus transcription in the productive virus life cycle*” (**Burley et al., 2020**).

Para garantizar la replicación del ciclo viral, el VPH debe seguir una línea de infección en las células hospederas, se necesita reactivar el ciclo celular para la obtención de factores de replicación viral (**Mac & Moody, 2020**). Las proteínas E6 y E7 son las encargadas de

mantener al estrato basal epidérmico indiferenciado (**Longworth & Laimins, 2004**), y poseen la capacidad de inducir a la célula a fase S prematura, con el fin de obtener nuevas proteínas tempranas E1 y E2 (**Brendle et al., 2014**) para el nuevo ciclo celular. E2 es una proteína de función regulatoria, contribuye a la replicación viral y regula la expresión génica del virus (**Mac & Moody, 2020**), es decir abre paso al nuevo ciclo de replicación viral.

### **1.1.3. El VPH y el cáncer**

#### **1.1.3.1. Oncogenicidad del VPH**

Las proteínas E6 y E7 son capaces de suprimir a los principales reguladores del ciclo celular p53 y pRb respectivamente del huésped (**Münger et al., 2004**), en cooperación con la proteína E5 responsable regulador de la diferenciación en queratinocitos y la evasión inmune (**Haręza et al., 2022**).

#### **1.1.3.2. Oncoproteína E6**

E6 funciona como supresor de la apoptosis e induce a la supervivencia e inmortalización de las células dañadas, ésta en conjunto con la ligasa celular E3 forma un heterodímero que se une a la proteína p53 degradándola (**Figura 4**). La p53 es una proteína supresora de tumores, y actúa como factor de transcripción de los genes necesarios para la apoptosis y regulación del ciclo celular. La p53 al ser degradada por E6 desestabiliza el genoma huésped dando paso a la proliferación ininterrumpida de las células infectadas, factor crítico en el desarrollo de neoplasias epiteliales. Cabe recalcar que las proteínas de E6 de los BR-VPH únicamente inhiben p53, mientras que los de AR-VPH son capaces de unirse a la región central de p53 degradándola por completo (**Haręza et al., 2022**).

#### **1.1.3.3. Oncoproteína E7**

E7 es una fosfoproteína que posee la capacidad de supresión de pRB (**Figura 4**). La proteína pRB es un supresor tumoral que marca el inicio de una cadena de reacciones para

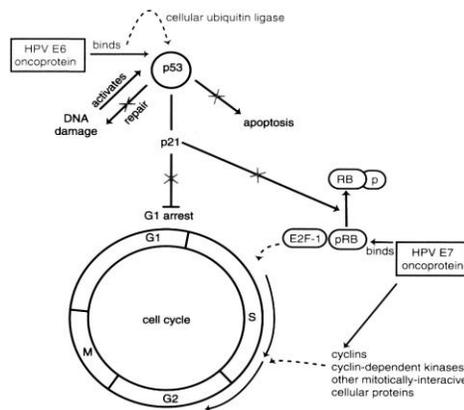
el control negativo del ciclo celular y la progresión tumoral. Esta proteína regula el ciclo celular mediante la supresión de los factores de transcripción E2F responsable de la producción de ciclinas que dan paso a la entrada a la fase S del ciclo celular. Al degradar pRB, la célula hospedera entra en fase S de forma inmadura e incontrolada. Además, E7 posee la capacidad de unirse al complejo DREAM y la proteína p130 importante en la progresión del ciclo celular, siendo esta otra vía para la proliferación celular descontrolada (Hareža et al., 2022).

#### 1.1.3.4. Oncoproteína E5

E5 es una proteína que se asocia al aparato de Golgi, las membranas citoplasmáticas y los endosomas; juega un papel importante en la disminución de la acidificación endosomal aumentando la capacidad de señalización de receptores de la célula hospedera e interrumpe la función de las proteínas I y II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La proteína E5 no participa directamente en el proceso de formación de neoplasias, sin embargo, es considerada oncogénica por la capacidad de regulación de otras proteínas como E6. El complejo E5-E6 es fundamental para la formación de coilocitos, los coilocitos son marcadores morfológicos de la infección por VPH (Hareža et al., 2022).

**Figura 4.**

*Patogénesis de los VPH oncogénicos*



**Nota.** Adaptado de: “*Human Papillomavirus and Cervical Cancer*” (Burd, 2003)

### 1.1.3.5. Estadísticas

Debido a que la diana de infección del VPH es el estrato basal de la epidermis, el VPH puede infectar la mayoría de los tejidos de revestimiento de la piel, especialmente las células escamosas, esto incluye el cuello uterino, la cavidad orofaríngea, ano, pene, vagina y vulva. La mayoría de los cánceres producidos por este virus llevan el nombre de carcinoma de células escamosas, sin embargo, algunos VPH tienden a infectar las células glandulares del cuello uterino, a este tipo de cáncer se lo denomina adenocarcinomas (Instituto Nacional del Cáncer, 2022). Los cánceres y su incidencia según el área afectada se describen en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.**

Incidencia del VPH en el desarrollo del cáncer

<b>Sitio del Cáncer</b>	<b>Porcentaje de incidencia</b>	<b>Casos de cáncer por año</b>	<b>Casos de cáncer por año provocado por VPH</b>
Cérvix	91%	12.293	11.100
Vagina	75%	879	700
Vulva	69%	4.282	2.900
Pene	63%	1.375	900
Ano (F)	93%	5.106	4.700
Ano (M)	89%	2.425	2.200
Orofaringeo (F)	63%	3.617	2.300
Orofaringeo (M)	72%	17.222	12.500
<b>TOTAL</b>	<b>79%</b>	<b>47.199</b>	<b>37.300</b>
<b>Femenino</b>	<b>83%</b>	<b>26.177</b>	<b>21.700</b>
<b>Masculino</b>	<b>74%</b>	<b>21.022</b>	<b>15.600</b>

**Nota. F:** Femenino **M:** Masculino. Los estudios están basados en la población de EE. UU. Adaptado de: “How many cancers are linked with HPV each year?” (Centers for Disease Control and Prevention, 2022).

Se estima que, en Estados Unidos, el VPH causa el 3% de todos los cánceres en hombres y 2% en mujeres; de 45 mil casos de cáncer en sitios donde frecuenta a infectar el VPH, 36 mil son confirmados a causa de este. A nivel global el VPH tienen una incidencia mayor; alrededor del 5% de todos los cánceres en todo el mundo son causados por este virus y se calcula que 570 mil mujeres y 60 mil hombres desarrollan un cáncer relacionado con el VPH cada año (**Instituto Nacional del Cáncer, 2022**).

#### **1.1.3.6. Cáncer de cuello uterino**

A nivel mundial el cáncer cervicouterino es la cuarta causa de cáncer en mujeres, en el 2020 se estimó que de 604 mil mujeres diagnosticadas con cáncer de cérvix al menos 342 mil murieron a causa de este, es decir el 56.6% de todos los casos (**World Health Organization, 2022**).

En el caso de América Latina y el Caribe, el cáncer cervicouterino es el tercer cáncer más frecuente entre las mujeres, cada año más de 56 mil mujeres son diagnosticadas con cáncer de cuello uterino y alrededor de 28 mil pierden la vida a causa de esta patología, las cifras aumentan si se incluyen a EE. UU y Canadá a 72 mil y 34 mil respectivamente (**Organización Panamericana de la Salud, 2019**).

Aproximadamente el 95% de casos de cáncer de cuello uterino es provocado por VPH, el 99% de estos está relacionado con AR-VPH (**World Health Organization, 2022**), y cerca del 50% de los precánceres de cuello uterino de alto grado es causado por los genotipos de AR-VPH 16 y 18 (**World Health Organization, 2023**).

#### **1.1.4. Incidencia del VPH a nivel global**

En la actualidad la infección por VPH es considerada la ITS de mayor incidencia a nivel mundial (**Sarikaya et al., 2022**). Se estima que casi todas las personas a nivel mundial se infectan por VPH al menos una vez durante su vida (**OPS, 2020**). Según la OMS en el 2017, se estimó que a nivel mundial la prevalencia de VPH en mujeres es del 11.7% y

especialmente en América Latina y el Caribe, se presentó 16.1% de prevalencia, el segundo más alto después de África Sub Sahariana (24%), mientras que en los hombres la prevalencia en todas las regiones del mundo es del 21%. Todas las personas tienen riesgo de infectarse independientemente del sexo, sin embargo, las mujeres tienen riesgo a desarrollar cáncer cervicouterino por una infección de un genotipo carcinogénico, así como las personas inmunocomprometidas (**OPS, 2020**).

### **1.1.5. Incidencia del VPH a nivel nacional**

El cáncer cervicouterino es la segunda causa de muerte de mujeres en el Ecuador con un porcentaje de morbilidad y mortalidad del 36% y 46% respectivamente (**García Regalado et al., 2021**). En el año 2009 los genotipos prevalentes de VPH fueron 6, 66, 16, 31 y 44 de los cuales el 20.2% representaba un AR-VPH; para el 2017 estudios apuntaron que las variantes predominantes en el territorio nacional fueron 16, 18, 58, 51, 59 en donde AR-VPH representa el 39.6% de todos los casos (**Moya-Salazar & Rojas-Zumaran, 2017**). Según el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) en un sondeo a nivel de región litoral desarrollado en 120 pacientes, tuvo como resultado una tasa de casos positivos del 83.3% (100/120), de los cuales el 45.9% corresponde al tipo 16; 24.6% al tipo 58; el 4.9% al tipo 31 y el restante 24.6% repartido entre los genotipos 18, 33, 39, 52, 56, 69 y 70 (**Bedoya, 2019**).

La prevalencia de los genotipos varía según la zona geográfica, en el caso del Azuay, en la investigación “Infección por virus del papiloma humano en mujeres del Cantón Cañar, Ecuador” conducida por la Universidad Católica de Cuenca (**Carrión et al., 2020**), se expusieron las estadísticas de infección del VPH, de 100 muestras tomadas en el ensayo 51 de estas fueron positivas, de las mismas el genotipo 31 fue el más frecuente (56.9%) seguido por el genotipo 58 (43.1%) y los genotipos 66 y 59 (29.4% y 23.5% respectivamente). Los genotipos BR-VPH estuvieron en menor porcentaje, generalmente presentes en casos de coinfección.

En el estudio dirigido por **Rivera et al., (2018)**, en un análisis mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación Sanger de 431 muestras de Solca Loja se determinó que los principales tipos de VPH presentes en muestras premalignas y malignas son los genotipos 16 y 18, además de los genotipos 58 y 51 que representan el tercer y cuarto lugar en incidencia respectivamente presentes en infecciones simples o coinfecciones. Así mismo en contagios anorrectales prevalecen las variantes oncogénicas 33 y 66, mientras que en la población del litoral se mantiene al genotipo 58 como el predominante, seguido del genotipo 16.

En el caso de Quito en el estudio realizado por **Mejía et al., (2016)** en el Hospital Oncológico de SOLCA se expuso que el 86.0% de los casos de infección por VPH son cancerosos con alta predominancia de los genotipos 16 y 58 y en menor proporción el genotipo 18. El VPH 58 posee mayor incidencia en coinfecciones, presente de manera frecuente en todos los grados de lesión seguido de los tipos 52, 6, 11, 66, y 31 (**Aragones et al., 2016**)

#### **1.1.6. Variación geográfica del VPH**

La prevalencia del VPH varía sustancialmente entre las diferentes poblaciones, debido al nivel socioeconómico, la edad, el origen étnico y la ubicación geográfica que posee cada nación, la distribución de los genotipos de VPH difiere alrededor de todas las regiones del mundo (**Tang et al., 2021**).

Así lo evidencian los estudios de distribución geográfica que se realizan en cada país, se puede mencionar el entonces al estudio de **Nakagawa et al., (2013)** en Arkansas en el cual se describió la distribución del VPH entre grupos étnicos de una misma zona, dando como resultado la variación en la prevalencia de genotipos entre hispanoamericanos (58), africanos (55 y 83), estadounidenses descendientes de europeos (39) y estadounidenses de origen africano (35 y 54).

La distribución del VPH entre continentes es aún más notoria, por ejemplo, en el estudio propuesto por **Tang et al., (2021)** en la provincia de Hunan, China, prevalecen los genotipos 58, 52, 39, 51, 53 mientras que, en Guatemala en el continente de occidente, es notoria la prevalencia de los genotipos 16, 18, 39, 58, 52 y 45.

### 1.1.7. Diagnóstico de VPH

Los métodos para la detección del VPH incluyen técnicas de citología celular, inmunohistoquímica y técnicas moleculares que se detallan a continuación

#### 1.1.7.1. Métodos de diagnóstico convencional

**Tabla 4.**

*Diagnóstico convencional de VPH*

Método	Descripción
Colposcopia y prueba de ácido acético	Este método es dirigido a la búsqueda anormalidades relacionadas con lesiones de severidad teñidas con ácido acético, se utiliza el colposcopio, En este examen se visualiza lesiones clínicas y se identifica lesiones para biopsia asociadas al VPH
Biopsia	Es el estudio citológico de una parte o el total de un tejido anómalo extraído mediante una colposcopia. La muestra es analizada bajo microscopia en busca de displasias, cáncer o la presencia de coilocitos
Prueba de Papanicolau	Es una prueba descrita por primera vez por Papanicolau y Traut, el objetivo de esta es detectar cambios premalignos y malignos, así como las infecciones virales precursoras (VPH/Herpes), esta prueba requiere de métodos moleculares para confirmar la patología

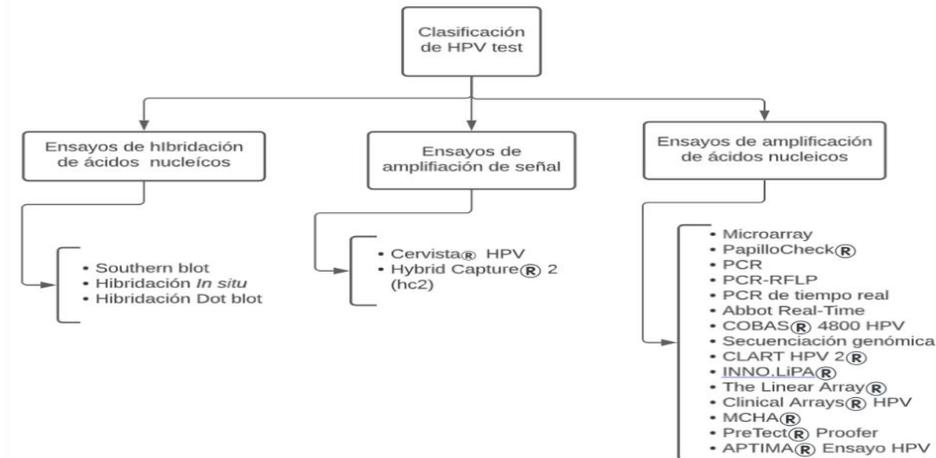
**Nota.** Adaptado de: “Laboratory diagnosis of human papillomavirus virus infection in female genital tract” (**Marfatia et al., 2011**).

### 1.1.7.2. Métodos de diagnóstico molecular

Las pruebas moleculares se pueden dividir en tres grupos principales (Figura 5).

#### Figura 5.

Clasificación de las pruebas moleculares para la detección de VPH



**Nota.** Adaptado de: “A review of methods for detect human Papillomavirus infection.” (Abreu et al., 2012).  
**Fuente:** Ludichart

#### 1.1.7.2.1. Ensayos de hibridación de ácidos nucleicos

Estos ensayos utilizan ácidos nucleicos marcados que hibridan con las muestras, estas técnicas generan información de alta calidad, sin embargo, es muy poco sensible, requiere de grandes cantidades de ADN purificado además de que el procesamiento de la muestra conlleva largos periodos de tiempo (Abreu et al., 2012).

#### 1.1.7.2.2. Ensayos de amplificación de señal

Son métodos de amplificación de señales no radioactivo que se basa en la hibridación del ADN objetivo con sondas de ARN específicas, generalmente no son usados para la identificación de genotipos individuales, sin embargo, poseen la capacidad de distinguir entre genotipos AR-VPH y BR-VPH con altas tasas de sensibilidad y especificidad entre estos dos grupos (Abreu et al., 2012).

### **1.1.7.2.3. Ensayos de amplificación de ácidos nucleicos**

Estos métodos se basan en la amplificación directa de ADN/ARN objetivo, básicamente se realiza una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en todos los ensayos que utilizan esta tecnología. Estas técnicas son altamente sensibles, específicas y ampliamente utilizadas. Generan alrededor de mil millones de copias de una sola molécula después de solo 30 ciclos de reacción, y los amplicones producidos pueden ser analizados por separado si es el caso, mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción, ensayos de sonda lineal, secuenciación directa o cebadores específicos para cada genotipo, esta última abre paso a la genotipificación del VPH en sus variantes (**Abreu et al., 2012**).

### **1.1.8. PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada en los primeros años de la década de los 80 y utilizada para diversas tareas como, clonación molecular, secuenciación, mutagénesis *in vitro*, clonación de cADN, gADN entre otras (**Green & Sambrook, 2019**). La PCR es una reacción enzimática *in vitro* que permite la amplificación de millones de cadenas de ADN específico, mediante un ciclo de tres reacciones principales, desnaturalización, hibridación y amplificación (**Tamay de Dios et al., 2013**).

#### **1.1.8.1. Componentes esenciales de la PCR**

##### **1.1.8.1.1. Polimerasa termoestable dependiente de ADN**

Las polimerasas son enzimas con acción catalítica para la síntesis de ADN. La *Taq* polimerasa es una enzima termoestable aislada por primera vez de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* (*Taq*) la cual habita a condiciones extremas de temperatura (**Abramson, 1995**). Es una enzima de 832 aminoácidos de longitud, cuya actividad específica es de 292.000 unidades/mg, su actividad máxima se registra entre los 75 – 80°C (**Green & Sambrook, 2019**) y la velocidad de amplificación de esta enzima es de 75 nucleótidos por segundo, a temperatura de 70°C (**Tamay de Dios et al., 2013**)

### 1.1.8.1.2. Primers o Cebadores

Son secuencias de oligonucleótidos complementarias que delimitan y flanquean la secuencia objetivo a amplificar (**Tamay de Dios et al., 2013**). Los primers o cebadores son uno de los factores más influyentes en el proceso de amplificación, de estos dependen en mayor parte la especificidad y eficiencia de la reacción (**Green & Sambrook, 2019**). En la **Tabla 5** se describen algunos de los parámetros a ser considerados en el diseño de oligonucleótidos (primers) a ser considerados.

**Tabla 5.**

*Características óptimas para el diseño de primers*

<b>Propiedad</b>	<b>Diseño Óptimo</b>
Composición	El contenido de GC debe estar entre 40 y 60%. La distribución de las 4 bases debe ser heterogénea evitando segmentos de polipurinas, polipirimidinas o repetición de dinucleótidos. Evitar tramos ricos en GC ya que son propensos a formar estructuras secundarias.
Longitud	Deben tener una extensión entre 18-30pb, y las parejas del mismo grupo no deben diferir en más de 3pb de extensión. Primers <18pb tienden a ser inespecíficos y >30pb son propensos a formar estructuras secundarias
Complementariedad	<b>Auto complementariedad.</b> Las secuencias no deben formar auto dímeros en más de 3pb de longitud ya que es posible la formación de harpins e inhibir la hibridación con el ADN plantilla <b>Hetero complementariedad.</b> Se debe evitar la complementariedad entre las primeras tres bases del extremo 3´ de cada cebador. La formación de plegamientos entre las bases de los primers forward y reverse conllevan a la formación de heterodímeros competidores por desoxinucleotidos trifosfatos

<b>Propiedad</b>	<b>Diseño Óptimo</b>
	(dNTPs) y ADN polimerasa, inhibiendo la amplificación de ADN objetivo.
Temperatura de melting	La temperatura de melting debe estar entre 55-60°C y no deben diferir entre 2 a 3°C entre las parejas.
GC clamp	La presencia de G y C en al menos las últimas 5 bases del extremo aseguran un enlace fuerte entre la cadena de ADN plantilla y el cebador. Incrementan la especificidad y eficiencia de la PCR
Secciones de restricción	Se pueden agregar secuencias no complementarias al ADN objetivo en el extremo 5' de los cebadores, sin embargo, solo son necesarias cuando se va a realizar el corte con enzimas de restricción.
Especificidad	Se debe verificar mediante herramientas bioinformáticas la especificidad de los cebadores a las zonas de flanqueo deseada, con el fin de evitar la amplificación inespecífica en zonas homólogas donde los cebadores puedan pegarse.
rt-PCR primers	En la PCR de retro transcripción es recomendable diseñar cebadores que abarquen las uniones exón-exón del ARNm o que se unan a estas uniones, para evitar la amplificación falsa positiva

**Nota.** Adaptado de: “*Polymerase Chain Reaction*” (Green & Sambrook, 2019)

#### **1.1.8.1.3. Desoxinucleotidos trifosfatos (dNTPs)**

Son los “ladrillos”, bases nitrogenadas (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) las cuales utiliza la Taq polimerasa para la síntesis de las nuevas cadena de ADN (Green & Sambrook, 2019). Las concentraciones de dNTPs se encuentran en cantidades equimolares y trabajan a concentraciones entre 0.2 a 1.0 mM (Tamay de Dios et al., 2013).

#### **1.1.8.1.4. Cationes divalentes**

Todas las ADN polimerasas requieren cationes divalentes libres, usualmente el Mg<sup>2+</sup> para su funcionamiento. Los iones de magnesio cumplen dos funciones principales, formar

complejos con los dNTPs para ser sustratos de la *Taq* polimerasa y la estabilización de los complejos primer-ADN. En algunas ocasiones se ha intentado usar  $Mn^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  pero han resultado ineficientes, no existe una concentración óptima para el uso en PCR, sin embargo, la concentración frecuentemente utilizada es de 1.5mM (**Green & Sambrook, 2019**).

#### 1.1.8.1.5. Buffer de pH

Sirve para proporcionar el ambiente de reacción adecuado para la PCR, mantiene el pH entre 8.3 – 8.8 a temperatura ambiente, pues al llegar a los 72°C el pH de la reacción se reduce considerablemente a 7.2 (**Green & Sambrook, 2019**). El buffer más utilizado es el Tris-HCL, pero también existen otros de composición distinta en el mercado (**Tamay de Dios et al., 2013**).

#### 1.1.8.1.6. Cationes monovalentes

Son utilizados para la amplificación de fragmentos superiores a 500pb de longitud y generalmente se utiliza el KCl a concentración de 50mM (**Green & Sambrook, 2019**).

#### 1.1.8.1.7. ADN plantilla

Es la cadena de ADN que tiene la secuencia objetivo, puede ser de cadena simple, de doble cadena y de cadena circular, este último con una eficiencia ligeramente menor a los anteriores. El tamaño del ADN plantilla es irrelevante, sin embargo, se puede realizar una digestión enzimática para ADN superior a 10 kb (**Green & Sambrook, 2019**).

**Tabla 6.**

*Condiciones de componentes estándar para la PCR catalizada por ADN polimerasa*

Parámetro	Condiciones
ADN plantilla	$10^4$ - $10^5$ copias mínimas o 10ng/ $\mu$ l

<b>Parámetro</b>	<b>Condiciones</b>
Número de ciclos	25 – 45 ciclos
Primers o cebadores	0.1 – 0.5µM
Mg <sup>2+</sup>	Concentración entre 1.5 a 2.0 mM
dNTPs	Cada dNTP debe tener una concentración de 200 µM. Si se aumenta la concentración se debe aumentar el Mg <sup>2+</sup>
Taq polimerasa	1.0 – 1.25 unidades/reacción (50µL)
Aditivos	Depende la PCR se puede utilizar glicerol (5 – 10%), seroalbúmina bovina (0.8µg/uL), formaldehído (1%-5%) DMSO (2% -10%) o betaína (0.5 - 2µM) para incrementar la eficiencia de la PCR.

**Nota.** Adaptado de: “*Polymerase Chain Reaction*” (Green & Sambrook, 2019)

### 1.1.8.2. Etapas de la PCR

El proceso de la PCR se divide en tres procesos principales desnaturalización, hibridación y extensión que se describen en la **Tabla 7** y la **Figura 6**.

**Tabla 7.**

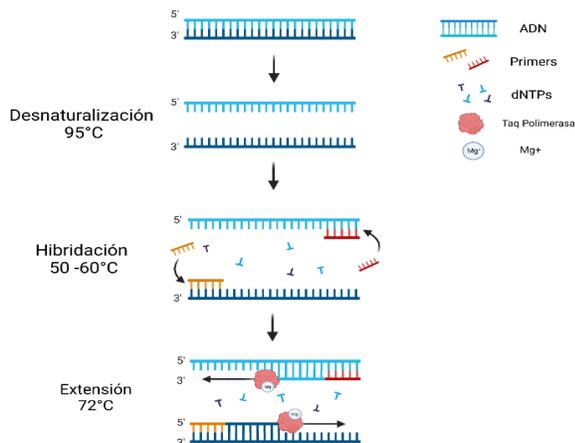
Etapas de la PCR

<b>Etapas</b>	<b>Descripción</b>
Desnaturalización	Esta etapa corresponde a la separación de la doble hebra de ADN mediante calentamiento a 95°C de 20 a 30 segundos. Las cadenas de ADN están unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno presentes en las bases nitrogenadas guanina, citosina, timina y adenina. Depende del número de enlaces G-C y A-T para el desdoblamiento de la cadena, mientras más enlaces G-C existen mayor será la energía que se necesita para desdoblar la cadena lo contrario de A-T que

Etapa	Descripción
Annealing	<p>requieren de menor energía para el desdoblamiento (<b>Tamay de Dios et al., 2013</b>)</p> <p>Es la etapa donde los primers o cebadores, pequeñas secuencias de aproximadamente 18 a 30 nucleótidos, se alinean al extremo 3' de la cadena principal y 5' de la secuencia complementaria con el fin de identificar un segmento en específico. La temperatura de melting generalmente ronda los 50 a 60°C (<b>Tamay de Dios et al., 2013</b>).</p>
Extensión	<p>En esta etapa la enzima <i>Taq</i> polimerasa actúa con el complejo cebador-temple y empieza su función de síntesis a gran velocidad junto a los dNTPs la dirección de la síntesis es de 5' a 3'. La temperatura para esta reacción depende del tipo de polimerasa que se utilice, pero generalmente ronda los 72°C (<b>Tamay de Dios et al., 2013</b>).</p>

**Figura 6.**

*Etapas de un ciclo de PCR*



**Notas.** Recuperado de: “Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real” (**Tamay de Dios et al., 2013**).

### **1.1.9. Real Time PCR (RT-PCR)**

La PCR en tiempo real es una variación de la PCR convencional. Mientras que ésta última analiza los productos en un punto final, la RT-PCR posee la capacidad de medir la acumulación de producto a medida que avanza la reacción ciclo por ciclo, mediante el uso de reporteros fluorescentes (**Tamay de Dios et al., 2013**).

La RT-PCR es actualmente el método más sensible, específico y eficiente para la amplificación de ácidos nucleicos, los componentes de la reacción son los mismos utilizados en la PCR convencional. La enzima polimerasa, dNTPs,  $Mg^{2+}$ , buffer y sistema reportero de fluorescencia generalmente se agrupan en una sola solución denominada Máster-mix (**Tamay de Dios et al., 2013**).

#### **1.1.9.1. Sistemas de Reporte de Fluorescencia**

Existen dos sistemas de reporte de fluorescencia utilizado en RT-PCR, los métodos específicos y no específicos que se detallan a continuación:

##### **1.1.9.1.1. Métodos inespecíficos**

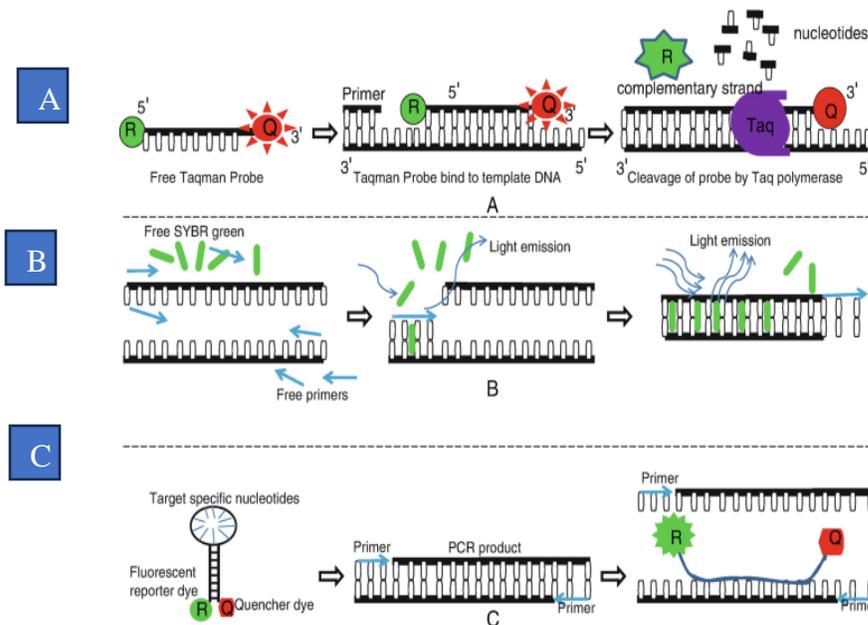
Usan como reporteros de fluorescencia a moléculas intercalantes con afinidad por el ADN que al ser oxidados mediante la amplificación generan fluorescencia que es proporcional al número de copias de ADN. El reportero más utilizado por los investigadores es el SYBR Green debido a su bajo costo, en soluciones no emite fluorescencia, no obstante, al ligarse al surco menor del ADN incrementa mil veces su fluorescencia. Es considerado inespecífico debido a que puede pegarse a productos inespecíficos, dímeros de primers o cualquier cadena doble de ADN, sin embargo, se puede optimizar la reacción (**Tamay de Dios et al., 2013**) (**Figura 7**)

### 1.1.9.1.2. Métodos específicos

Utilizan el principio de transferencia de energía de resonancia magnética (FRET) por sus siglas en inglés, este método consiste en la emisión de energía desde un donador o reportero fluorescente a un “quencher” o aceptor (Tamay de Dios et al., 2013) (Figura 7)

Figura 7.

Métodos para reporte de fluorescencia

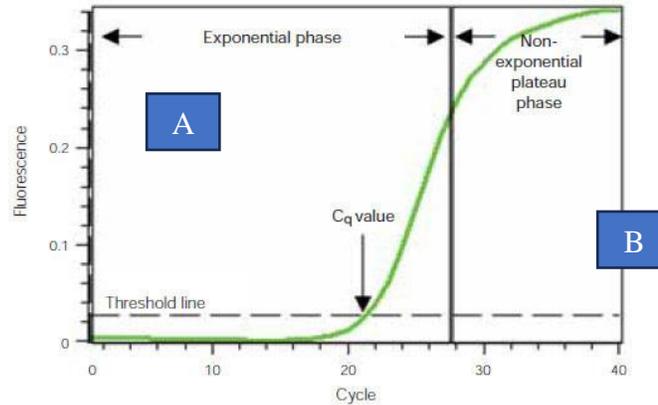


**Nota.** A) Taq Man B) SYBR Green C) Beacons. Adaptado de: “Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Based Identification and Detection of Fungi Belongs to Genus *Fusarium*” (Yadav & Singh, 2017).

La señal de fluorescencia emitida es detectada por equipos que poseen la tecnología para excitar al reportero, capturar la señal de emisión y realizar el análisis cuantitativo; los equipos se diferencian generalmente por la fuente de energía que produce para la excitación estos pueden ser lámparas de luz, luz led y láseres. Los datos de absorbancia son cuantificados y se representan en gráficas de amplificación de señal (Figura 8) (Tamay de Dios et al., 2013).

**Figura 8.**

*Curva de amplificación por RT-PCR*



**Nota.** En la gráfica se observa dos fases una exponencial (A) y una fase no exponencial o de meseta (B). En la fase exponencial la cantidad de ADN se duplica, mientras que en la fase de meseta los reactivos se consumen volviéndose limitantes y deteniendo la reacción. Adaptado de: “¿Qué es la PCR en tiempo real (qPCR)?” (BIORAD, 2023b).

### 1.1.9.2. RT-PCR términos usualmente usados

#### 1.1.9.2.1. Ciclo de cuantificación o de umbral (Cq/Ct)

Es el número de ciclo a la cual la muestra alcanza el punto crítico para ser detectado o cuantificado, según el ensayo que se está corriendo, gráficamente es el ciclo en el cual la señal fluorescente de la reacción cruza la línea de umbral (Threshold). El Ct (Cycle Threshold) generalmente es utilizado para calcular el número de copias iniciales de ADN ya que está inversamente relacionado con la cantidad de ADN objetivo a través de los ciclos (Life Technologies Corporation, 2012).

#### 1.1.9.2.2. Línea base o Baseline

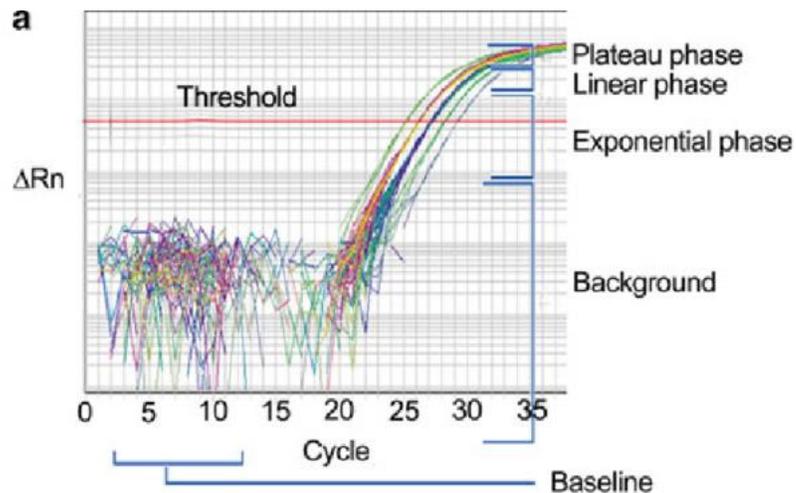
Se refiere al bajo nivel de señal de fluorescencia emitido en los ciclos tempranos de la PCR (Applied Biosystems, 2022), la línea base puede ser equiparada con el fondo o ruido del proceso y es determinada empíricamente para cada reacción por el análisis de usuario o el análisis automático del software de detección (Figura 9) (Life Technologies Corporation, 2012).

### 1.1.9.2.3. Umbral o Threshold

Intensidad de señal que refleja un aumento estadísticamente significativo sobre la línea base (**Applied Biosystems, 2022**). El umbral o threshold se establece para distinguir la señal relevante desde la línea base, el software de los instrumentos de real time, generalmente fija automáticamente el umbral en 10 veces la desviación estándar de la fluorescencia en la línea base (**Figura 9**) (**Life Technologies Corporation, 2012**).

**Figura 9.**

*Parámetros de la Real Time - PCR*



**Nota.** Adaptado de: “SYBR® Green and TaqMan® Quantitative PCR Arrays: Expression Profile of Genes Relevant to a Pathway or a Disease State” (**Alvarez & Doné, 2014**)

### 1.1.10. Prueba in house

Las pruebas *in house* son pruebas de patología que se desarrollaron o modificaron dentro de un laboratorio o red de laboratorios con el fin de realizar ensayos en muestras humanas a futuro, los datos están destinados a la mejora del diagnóstico clínico. Toda prueba que se desarrolla *in house*, pero fuera del laboratorio o redes de laboratorio autor del método, quedan fuera del parámetro *in house* se torna comercial y se debe presentar documentación de estándar correspondiente (**Department of Health and Aged Care, 2018**)

### **1.1.11. Importancia del diagnóstico molecular**

Según el Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP) el cáncer cervicouterino se encuentra entre las 10 principales causas de muerte en mujeres a nivel nacional (**Rivera et al., 2018**) y cuarto tipo de cáncer más mortífero a nivel mundial de estos el 99% de los mismos es provocado por AR-VPH; de aquí radica la importancia de un rápido y eficaz diagnóstico a nivel molecular, pues su temprana detección en cuanto a variante y sublinaje del mismo ayuda principalmente al triaje del paciente y el correcto tratamiento del paciente, así como la aplicación de las vacunas contra esta patología.

Un diagnóstico temprano del cáncer de cuello uterino y sus causas han dado como resultado en la disminución del 50% de las tasas de incidencia y mortalidad desde 1970; en el caso del VPH la detección de los genotipos de alto riesgo y oncoprecursores son vitales para la emisión de un correcto diagnóstico y la aplicación un eficaz tratamiento al paciente (**Rivera et al., 2018**).

Las pruebas citológicas han sido una de las actividades de prevención más exitosas a nivel mundial, sin embargo, presentan limitaciones como la baja sensibilidad y la mala reproducibilidad al contrario de las pruebas moleculares que poseen beneficios como mayor sensibilidad, especificidad y reproducibilidad; además de la capacidad de automatización y automuestreo (**Williams et al., 2022**).

Este proyecto fue desarrollado entonces, como un prototipo de prueba *in house* para la futura implementación en el diagnóstico molecular para el Laboratorio de Especialidades Médicas Ochoa & Ochoa (LEM Ochoa), el mismo que fue dirigido bajo la tutela del Ing. Luis Domínguez y desarrollado en las instalaciones de la mencionada institución.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo General**

Diseñar y estandarizar un protocolo de diagnóstico molecular por RT-PCR para la genotipificación de las variantes de VPH predominantes en Ecuador (Genotipos 16, 18, 45, 58, 31)

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

- Diseñar cebadores específicos para la detección de VPH genotipos 16, 18, 45, 58, 31
- Determinar el mejor programa de termociclado para la amplificación de genes que permita la detección de VPH 16, 18, 45, 58, 31.
- Analizar mediante parámetros de desempeño el límite de detección del protocolo e integridad de los amplicones de ADN producto de PCR.

## CAPÍTULO II

### METODOLOGÍA

#### 2.1 Materiales

**Tabla 8.**

*Equipos de Laboratorio*

<b>Equipos</b>	<b>Cantidad</b>
Congelador (-20°C)	1
Nevera (-4°C)	1
Cabina de Flujo Laminar	1
Centrífuga	1
Vórtex	1
Micropipetas	1
Lámpara de luz UV	1
Termociclador BIORAD CFX96	1
Transiluminador UV ChemiDoc ®	1
Fuente de alimentación eléctrica	1
Balanza Analítica	1
Microondas	1
Cámara de Electroforesis	1

**Tabla 9.**

*Reactivos de Laboratorio*

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
BlaTaq 2X qPCR Master Mix (G891)	500X
Etanol 96%	10mL
Etanol 70%	1000mL

<b>Reactivos</b>	<b>Cantidad</b>
Cloro 5%	1000mL
Buffer TBE 2X	500mL
Agua destilada	20mL
Agarosa	15g
Buffer de carga 6X Blue Juice (Invitrogen).	50 $\mu$ L
Marcador de peso molecular <i>TrackIt</i> <sup>TM</sup>	50 $\mu$ L

**Tabla 10.**

*Materiales de Laboratorio*

<b>Materiales</b>	<b>Cantidad</b>
Puntas con filtro 10 $\mu$ L	6 cajas
Puntas con filtro 200 $\mu$ L	2 cajas
Puntas con filtro 1000 $\mu$ L	1 caja
Tubos 0.2 mL para PCR (Expell)	1000 unidades
Tubos 1.5mL para eluido (Axygen)	1 caja (1000 unidades)
Vaso de precipitación	3 unidades
Matraz Erlenmeyer	2 unidades
Espátula	1 unidad
Varilla de agitación	1 unidad
Guante térmico	1 unidad

**Tabla 11.**

*Materiales de escritorio*

<b>Insumos y Materiales</b>	<b>Cantidad</b>
Mascarillas	1 caja (100 unidades)
Cofias	1 caja (50 unidades)
Guantes	1 caja (50 pares)

<b>Insumos y Materiales</b>	<b>Cantidad</b>
Zapatones	1 caja (50 pares)
Alcohol antiséptico	1 frasco
Gel antibacterial	1 frasco
Jabón líquido	1 frasco
Esferos	2 unidades
Rotuladores	2 unidades
Computador	3 dispositivos
Hojas de Papel Bond A4	1 paquete

## **2.2 Métodos**

### **Diseño *in silico***

#### **2.2.1 Revisión bibliográfica**

La revisión bibliográfica se realizó tomando en cuenta las palabras clave: VPH, type 16, type 18, type 45, type 58, type 31, VPH Ecuador, Real Time- PCR. Se consideraron los artículos publicados desde 2015 hasta el 2023. Además, para la revisión se tomó en cuenta la base de datos PubMed, datos del Ministerio de Salud Pública del Ecuador (MSP), estadísticas del Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI) y el Hospital de SOLCA a nivel nacional, además del software Mendeley para la organización de los artículos utilizados. A partir de este se determinó los VPH de mayor incidencia en Ecuador, y las cepas más frecuentes en territorio nacional que fueron VPH genotipos 16, 18, 45, 58, 31

#### **2.2.2 Bioinformática**

Para la fabricación de primers, se realizó la búsqueda de las secuencias completas del genoma de VPH de los cinco genotipos seleccionados de acuerdo con el código de

identificación (**Tabla 12**) único de cada genotipo establecido por la base de datos NCBI Virus. Se establecieron criterios de inclusión para la selección de cada una de estas secuencias genómicas que se detallan en la **Tabla 13**.

**Tabla 12.**

*Código de taxón por genotipo de VPH*

<b>VPH</b>	<b>Taxonomy ID</b>
VPH 16	taxid 333760
VPH 18	taxid 333761
VPH 45	taxid 10593
VPH 58	taxid 10598
VPH 31	taxid 10585

**Tabla 13.**

*Criterios de inclusión, genomas de VPH*

<b>Característica</b>	<b>Requerimiento</b>
Integridad de nucleótidos	Completo
Región geográfica	Ecuador -> Sur América -> América -> Todo el mundo
Tipo de material genético	ADN
Hospedero	Humano / <i>Homo Sapiens</i>

Estos criterios se basaron en los filtros de la base de datos del NCBI Virus. En el caso del criterio de región geográfica se hizo un orden de prioridad de la secuencia, siendo primera prioridad secuencias descritas en Ecuador, al no contar con dicha información se escaló a una región geográfica más amplia pero que Ecuador sea parte de este.

Se obtuvieron los formatos FASTA y GenBank de cada una de las secuencias que cumplían con los criterios de inclusión establecidos y se los identificó con códigos provistos por el NCBI Virus

## 2.2.1 Alineamientos múltiples

### 2.2.2.1.1 Alineamiento global

El alineamiento múltiple se llevó a cabo cargando las secuencias de los genotipos de VPH obtenidos al software bioinformático Benchling, en donde se realizó alineamiento mediante el algoritmo Needleman-Wunch. Mediante análisis gráfico se analizaron las regiones conservadas, zonas con deleciones e inserciones en las secuencia. Se determinó a la zona más conservada para franquear los cebadores y se procedió a delimitar la secuencia de estudio

### 2.2.2.1.2 Alineamiento local

El alineamiento local fue realizado mediante la extracción de las secuencias del gen L1 de cada genoma completo de VPH por genotipo mediante el uso del algoritmo Smith-Waterman, se estableció una secuencia consenso y se determinó las zonas más conservadas de este gen para el diseño de cebadores.

## 2.2.2 Diseño de cebadores

Para el diseño de primers se utilizó los softwares Primer Blast del Centro Nacional de Información de Biotecnología y las herramientas en línea Primer3Plus, se escogió una pareja de primers para analizar la posible dimerización de estos mediante el software NetPrimer y OligoAnalyzer, además de las características descritas en la **Tabla 14**.

**Tabla 14.**

*Características óptimas de cebadores*

<b>Característica</b>	<b>Requerimiento</b>
Longitud de amplicón (producto)	150-250pb

<b>Característica</b>	<b>Requerimiento</b>
Tamaño de cebador	19-23 pb
Contenido de Guanina/Citocinas	55%
Temperatura de Melting	58.0 -60.0°C

A continuación, se determinó la especificidad y homología mediante nBLAST y primer BLAST y se descartó la complementariedad con patógenos característicos del tracto vaginal (**Tabla 15**).

**Tabla 15.**

*Principales patógenos del tracto vaginal*

<b>Patógeno</b>	<b>TaxID</b>
<i>Papillomaviridae</i>	(taxid:151340)
<i>Herpes simplex virus type 2 (HSV-2)</i>	(taxid:10310)
<i>Treponema pallidum</i>	(taxid:160)
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	(taxid:2130)
<i>Mycoplasma genitalium</i>	(taxid:2097)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	(taxid:485)
<i>Candida albicans</i>	(taxid:5476)
<i>Trichomonas vaginalis</i>	(taxid:5722)
<i>Chlamydias</i>	(taxid:51291)

**Nota.** Adaptado de: “*Relationship of Specific Bacteria in the Cervical and Vaginal Microbiotas with Cervicitis*” (Gorgos et al., 2015)

### **2.2.3 PCR *in silico***

Se llevó a cabo el proceso de PCR mediante el software bioinformático Serial Cloner Versión 2.6.1., donde se insertaron las secuencias de los primers, y las secuencias consenso (secuencia producto de alineamiento de genotipos) para cada genotipo en estudio, posteriormente se verificó la correcta amplificación de las zonas franqueadas por

los cebadores, obteniendo un producto de PCR que se utilizó en la construcción de genes sintéticos

Las secuencias amplificadas *in silico*, se unieron en constructos de 500 pb que posteriormente fueron sintetizadas en la empresa de biología molecular Gene Universal®, los genes sintéticos sirvieron como controles positivos para el establecimiento de los parámetros de la RT-PCR y optimización de esta.

Una vez que los cebadores cumplieron todas las características y parámetros mencionados, las secuencias de estos fueron enviadas a la empresa AZENTA® Life Sciences para su correspondiente síntesis.

### ***Diseño in vitro***

#### **2.2.4 Reconstitución de primers**

Los oligonucleótidos se resuspendieron en agua ultrapura grado PCR de ROCHE®, previamente, se calculó el volumen en relación con las moles de cada primer, para obtener una concentración de 100µM (10X). Se añadió el volumen de agua correspondiente a cada primer, se cerró herméticamente y se llevó a refrigeración a 4°C por 24 horas. Al siguiente día se realizaron 3 alícuotas de las soluciones para su conservación y posterior dilución (1X, 0.5X y 0.1X) que se usarán en ensayos posteriores

#### **2.2.5 Reconstitución de genes sintéticos**

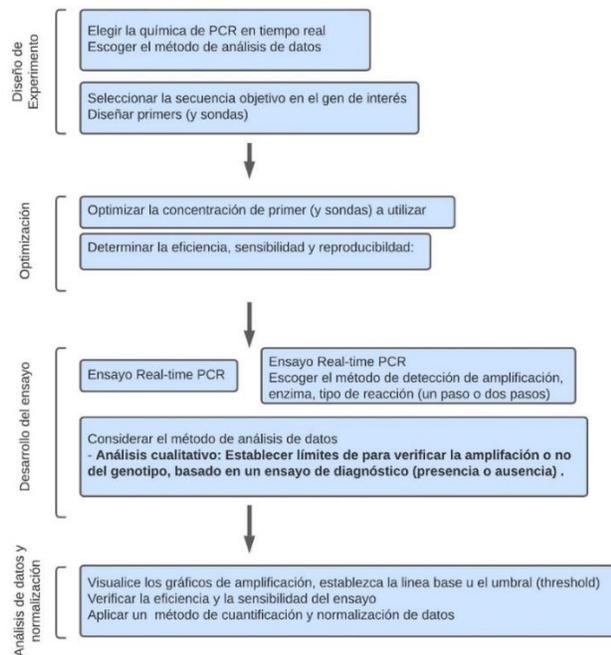
Para la resuspensión, se calculó volúmenes de agua ultrapura grado PCR de ROCHE ® para obtener una concentración de 10ng/µL de ADN y se añadió el volumen de agua correspondiente y se llevó a refrigeración a 4°C por 24 horas, posterior a esto se realizaron 2 alícuotas de cada uno para su conservación y dilución.

### 2.2.6 Real time-PCR (RT-PCR)

El desarrollo de la PCR de tiempo real se basó en el esquema para el desarrollo de experimentos propuesto por Green & Sambrook, (2018) en donde se detalla el orden lógico para el establecimiento de una PCR desde su etapa inicial, hasta el análisis de datos y la normalización de estos (**Figura 10**).

**Figura 10.**

*Diagrama de flujo experimental de los parámetros para RT-PCR*



**Nota.** Adaptado de “*Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data*” (Green & Sambrook, 2018).

Se realizó un esquema de experimentación para las variables de temperatura, tiempo, para la determinación del mejor proceso de RT-PCR para la genotipificación de los tipos 16, 18, 45, 58, 31. Además de la concentración mínima de cebadores para el ensayo (**Tabla 16**).

**Tabla 16.**

*Parámetros de la PCR a evaluar*

<b>Parámetro</b>	<b>Nivel</b>
Temperatura de Annealing	Gradiente de temperaturas
	30 segundos
Tiempo de Annealing	15 segundos
	0 segundos
	[1X]
Concentración de Primer	[0.5X]
	[1X]
Número de ciclos	<45 ciclos

#### **2.2.6.1 Temperatura de Annealing**

Para determinar la temperatura óptima de los primers se estableció un gradiente en relación con las temperaturas de melting ( $T_m$ ) que fue provista por los softwares bioinformáticos NetPrimer, Thermofisher calculator y los datos provistos por la empresa de síntesis de oligonucleótidos AZENTA®.

Los componentes de la reacción y el programa de termociclado se los detalla en la **tabla 17 y 18** respectivamente. Las muestras se cargaron en placas termorresistentes de 96 pocillos PCR LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 white, se añadió 19  $\mu$ L de MastetMix y 1  $\mu$ L de control de ADN correspondiente a cada genotipo de VPH en estudio, se programó el equipo de acuerdo con el ensayo a realizarse.

**Tabla 17.***Componentes de la RT-PCR para el ensayo temperatura de annealing*

<b>Componentes</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen Final (<math>\mu</math>L)</b>
Polimerasa BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix	1X	10
H <sub>2</sub> O Grado PCR ROCHE®	--	7
Primer Forward	10 $\mu$ M	1
Primer Reverse	10 $\mu$ M	1
ADN	--	1
Volumen total	--	20

**Tabla 18.***Condiciones de amplificación de la PCR para el ensayo Temperatura de Annealing*

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95°C	3 min.	1
Desnaturalización	95°C	15 s	45
Hibridación	Gradiente de temperatura	30 s	45
Extensión / Lectura	60°C	1 min	45
Mantenimiento	4	$\infty$	--

**2.2.6.2 Tiempo de annealing**

Se probó tres tiempos de annealing para cada genotipo de VPH, 30 segundos, 15 segundos y 0 segundos, Los componentes de la reacción y demás condiciones se mantuvieron para este ensayo, en la **Tabla 19 y 20** se detallan las condiciones

**Tabla 19.***Componentes de la RT-PCR para el ensayo tiempo de annealing*

<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen Final</b>
	<b>Final</b>	<b>(<math>\mu</math>L)</b>
Polimerasa BlasTaq™ 2X	1X	10
qPCR MasterMix		
H <sub>2</sub> O Grado PCR ROCHE®	--	7
Primer Forward	10 $\mu$ M	1
Primer Reverse	10 $\mu$ M	1
ADN	--	1
Volumen total	--	20

**Tabla 20.***Condiciones de amplificación de la PCR para el ensayo Tiempo de Annealing*

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95°C	3 min.	1
Desnaturalización	95°C	15 s	45
Hibridación	60°C o mayor	30 s / 0 s	45
Extensión / Lectura	60°C	1 min	45
Mantenimiento	4	$\infty$	--

**2.2.6.3 Concentración de Primer**

Se probaron tres concentraciones de primer 1X (10 $\mu$ M), 0.5X (5 $\mu$ M), 0.1X (1  $\mu$ M), para la concentración mínima de amplificación para los ensayos posteriores, los componentes y las condiciones se detallan en la **Tabla 21** y **Tabla 22** respectivamente

**Tabla 21.***Componentes de la RT-PCR para el ensayo concentración de primer*

<b>Componentes</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen Final (µL)</b>
Polimerasa BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix	1X	10
H <sub>2</sub> O Grado PCR ROCHE®	--	7
Primer Forward	1X, / 0.5X / 0.1X	1
Primer Reverse	1X, / 0.5X / 0.1X	1
ADN	--	1
Volumen total	--	20

**Tabla 22.***Condiciones de amplificación de la PCR para el ensayo concentración de primer*

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95°C	3 min.	1
Desnaturalización	95°C	15 s	45
Hibridación	60°C o mayor	15 s	45
Extensión / Lectura	60°C	1 min	45
Mantenimiento	4	∞	--

**2.2.6.4 Número de ciclos**

Se estableció variar el número de ciclos de acuerdo con la premura o retraso de amplificación de los controles, con los componentes para cada reacción de cada genotipo de VPH que se describen en la **Tabla 23** y las condiciones de reacción en la **Tabla 24**.

**Tabla 23.***Componentes de la RT-PCR para el ensayo número de ciclos*

<b>Componentes</b>	<b>Concentración</b>	<b>Volumen Final</b>
	<b>Final</b>	<b>(<math>\mu</math>L)</b>
Polimerasa BlasTaq™ 2X	1X	10
qPCR MasterMix		
H <sub>2</sub> O Grado PCR ROCHE®	--	7
Primer Forward	1X / 0.5X / 0.1X	1
Primer Reverse	1X / 0.5X / 0.1X	1
ADN	--	1
Volumen total	--	20

**Tabla 24.***Condiciones de amplificación de la PCR para el ensayo número de ciclos*

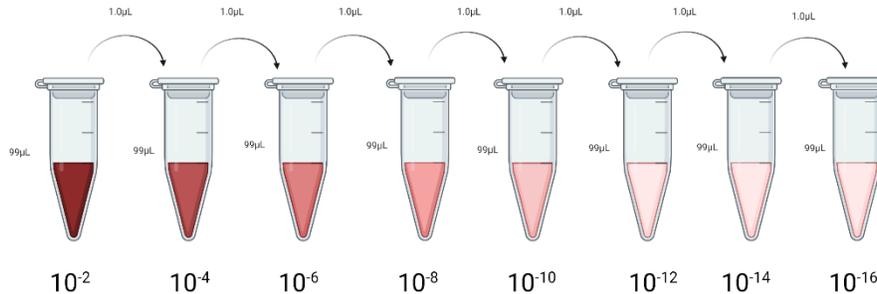
<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95°C	3 min.	1
Desnaturalización	95°C	15 s	45
Hibridación	60°C o mayor	15 s	45
Extensión / Lectura	60°C	1 min	45
Mantenimiento	4	$\infty$	--

**2.2.7 Límite de detección del protocolo**

Para determinar el límite de detección del protocolo se probaron diluciones (**Figura 11**) de diferentes concentraciones de material genético de VPH empezando por un factor de  $10^{-2}$  ng/ $\mu$ L hasta un factor de  $10^{-16}$  ng/ $\mu$ L se realizó el proceso de amplificación, y posteriormente se determinaron los parámetros límites de PCR como son el cycle treshold (Ct) y concentración mínima de ADN para el proceso de RT-PCR

**Figura 11.**

*Diluciones de los controles positivos de VPH*



**Nota. Fuente:** Biorender.com

### 2.2.8 Electroforesis

Se utilizó un gel de Agarosa al 2%, se pesó 0,8g de Agarosa y se pasó a un matraz Erlenmeyer para ser diluido en 40ml de buffer TAE, se agitó la mezcla por 15 minutos con el fin de hidratar el gel, a continuación, se calentó durante 30 s. en microondas hasta que empezó a ebullición. Una vez culminado se repitió el proceso de agitación y calentamiento por 4 ciclos hasta no tener la presencia de filamentos de agarosa.

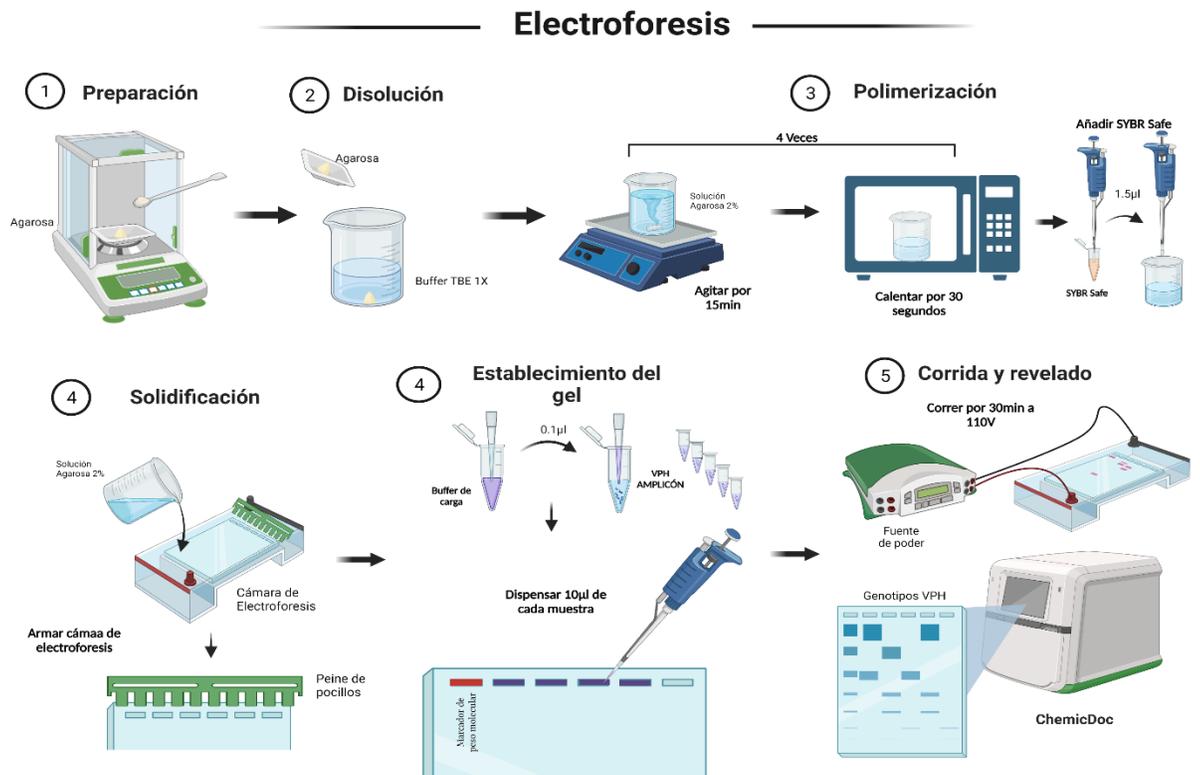
Se comprobó la temperatura de la solución de agarosa mediante tacto con la parte anterior de la mano y se añadió colorante de fluorescencia SYBR Safe 1,5 µl. A continuación, se vertió la solución de agarosa al 2% en la cámara de electroforesis para su respectivo secado, se debe evitar realizar burbujas, una vez seco se procedió a retirar la peiqueta de los pocillos y se procedió a cargar los mismos con las muestras problema. Las muestras se mezclaron con 0,1 µl de buffer de carga y se insertaron en cada uno de los pocillos procurando no romper las paredes del gel, se reservó el primero de ellos para el marcador de peso molecular *Ladder*.

Finalmente se armó los electrodos positivo y negativo y se dejó correr por 30 min a un voltaje de 100V. Terminado el tiempo de corrida, se sustrajo el gel de la cámara de electroforesis y se lo introdujo sobre la membrana del transiluminador ChemiDoc ®. Se

reveló el gel mediante luz UV, se fotografió y se analizó mediante software informático ImageLab 6.1 la presencia de bandas de ADN (**Figura 12**).

**Figura 12.**

*Electroforesis en gel de amplicones de VPH*



Fuente: Biorender.com

### 2.2.9 Establecimiento de protocolo para la genotipificación de VPH

Una vez establecidos todos los parámetros de la RT-PCR se describió el protocolo a utilizar para la genotipificación del VPH variantes 16, 58, 45, 18 y 31, protocolo que servirá como prueba de diagnóstico *in house* para el laboratorio de biología molecular

## CAPÍTULO III.-

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1.Revisión bibliográfica

En el Ecuador existen escasos estudios en los que se determinen las variantes genéticas que prevalecen en el territorio nacional en base a estudios moleculares. Para esta investigación se realizó la revisión de los artículos e investigaciones disponibles en bases de datos y repositorios institucionales de acuerdo con los criterios de inclusión y exclusión de la **Tabla 25**.

**Tabla 25.**

*Criterios para artículos de revisión*

<b>2Criterios de Inclusión</b>	<b>Criterios de Exclusión</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Artículos publicados desde el 2015 hasta la actualidad</li><li>• Artículos en idioma castellano o inglés.</li><li>• Artículos con investigaciones en Ecuador o que presenten datos epidemiológicos con respecto al VPH en este país.</li><li>• Artículos de acceso libre.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Artículos publicados antes del 2012</li><li>• Artículos que no presenten estadísticas acerca del VPH y sus variantes.</li><li>• Artículos provenientes de páginas de internet sin fin académico o de investigación.</li><li>• Artículos sin acceso a resultados o conclusiones.</li></ul>

**Nota.** Adaptado de: “*Situación actual de la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) asociado a lesiones cervicales en mujeres del Ecuador. Revisión sistemática*” **Fuente:** (Falcón-Córdova & Carrero, 2021).

Los artículos seleccionados se describen en la **Tabla 26.**, la información obtenida no fue homogénea ya que las diferentes investigaciones no tienen el mismo nivel de muestreo,

población de estudio o método de diagnóstico, sin embargo, poseen información relevante acerca de los genotipos que prevalecen en las principales urbes del Ecuador.

Acorde a la revisión bibliográfica, en la mayoría de las investigaciones en el Ecuador los genotipos 16, 58 y 31 son los que más frecuentan en muestras de riesgo carcinogénico, por lo cual se establece a estos tres genotipos como objetivo de investigación, así lo corrobora el estudio de revisión sistémica de **Yuxi & Gallegos, (2021)** el cual concluye que los genotipos de alto riesgo oncológico son los genotipos 16, 58 y 31, mientras que los de bajo riesgo oncológico son los serotipos 61, 81 y 6.

Así mismo estos tres genotipos han sido categorizados como los VPH de alto riesgo oncológico con mayor incidencia en América del Sur, así lo corrobora (**Clifford et al., 2005**) en su estudio de distribución mundial del VPH (**Figura 13**) ubicando al VPH 16 en primer lugar causal del 15% de las infecciones, en segundo lugar al VPH 58 responsable del 7% de las infecciones y en tercer lugar a los genotipos 45, 18 y 31 cada uno independientemente precursor de un 5% del total de infecciones, 15% en total en los tres genotipos. Acorde a la revisión bibliográfica, los genotipos 18 y 45 no inciden de manera significativa en el territorio nacional, sin embargo, se escogieron debido al alto potencial oncogénico a nivel de Sur América.

Es así como se definen los cinco genotipos objetivo para una prueba focalizada en el Ecuador, las variantes 16, 58, 45, 18 y 31 son el objetivo de diagnóstico en esta investigación.

**Tabla 26.***Información del VPH a nivel del Ecuador*

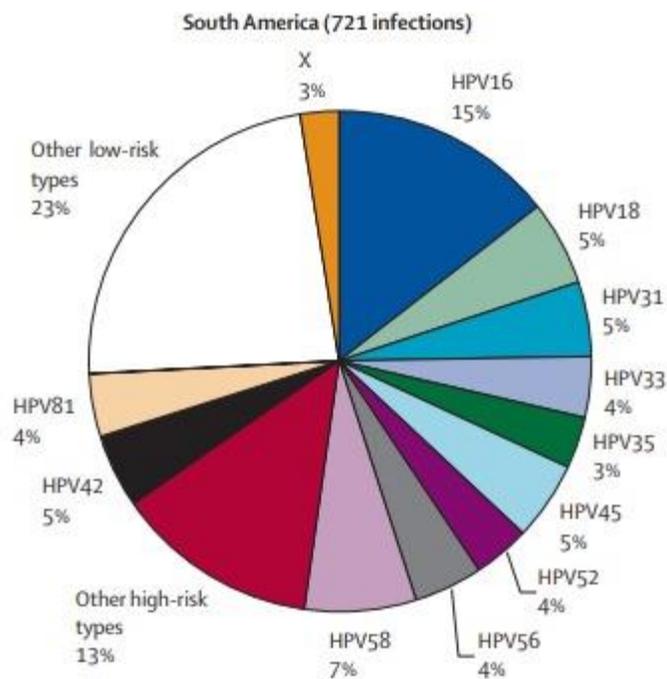
<b>N°</b>	<b>Año</b>	<b>Autor</b>	<b>Zona Geográfica</b>	<b>N= Casos</b>	<b>VPH (+)</b>	<b>AR-VPH</b>	<b>Variantes genotípicas</b>
1	2015	(Cabrera V. et al., 2015)	Azuay	500	25.6%	20.8%	66 (3.2%), 68 (2.8%), 16 (2.2%), 59 (2%) 31 (8%) Otros genotipos (<1%)
2	2015	(Silva et al., 2015)	Guayaquil	1000	35.20%	66.2%	16 (29.77%), 52 (16.18%) 51 (12.30%), 6 (9.71%) 59 (8.74%)
3	2016	(García Muentes et al., 2016)	Áreas Urbanas del Ecuador	1581	43.58%	25.24%	16 (5.5%), 33 (4.55%) 11 (3.80%)
4	2016	(Campoverde et al., 2016)	Cuenca	500	78.4%	51%	16 (26.2%) 18 (4.5%)
5	2016	(Mejía et al., 2016)	Quito	164	86%		16 (41.8%), 58 (30.5%) 18 (2.8%)

N°	Año	Autor	Zona Geográfica	N= Casos	VPH (+)	AR-VPH	Variantes genotípicas
6	2017	(Dalgo Aguilar et al., 2017)	Loja, Zamora, El Oro	431	64.7%	39.6%	16 (47.3%) .18 (15.5%) 58 (10%).
7	2017	Rodas et al. 2017 (Falcón-Córdova & Carrero, 2021)	Babahoyo	97	8.25%		Anticuerpos, 6 11, 18 y 16 ELISA
8	2017	(Caguana & Carreño, 2017)	Loja Morona Santiago, Cañar	323	34.09%	73.1%	58 (9.94%), 59 (8.77%) 39 (5.85%), 16 (5.26%), 31 (5.26%) 18, 45, (>5%)
9	2018	Ramos, G et al 2018 (Falcón-Córdova & Carrero, 2021)	Guayaquil	53	42%		33 (14%), 67 (14%)
10	2019	(Bedoya, 2019)	Región Litoral	120	83.3%	31.9%	16 (45.9%), 58 (21.6%) 31 (4.9%) Otros genotipos (24.6%)
11	2020	(Carrión et al., 2020)	Cantón Cañar	100	51%		31(56.9%) 58 (43.1%) 66 (24.9%) 59 (23.5%)

**Nota.** Adaptado y modificado de; “Situación actual de la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) asociado a lesiones cervicales en mujeres del ecuador. Revisión sistemática” (Falcón-Córdova & Carrero, 2021).

**Figura 13.**

Infecciones por genotipo de VPH en América del Sur



**Nota.** Adaptado de “Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis” (Clifford et al., 2005)

### 3.2. Bioinformática

#### 3.2.1. Base de datos

Las secuencias seleccionadas se escogieron de acuerdo con los criterios de inclusión, integridad de material genético, tipo de ácido nucleico, zona geográfica y hospedero, que se establecieron anteriormente en la sección de metodología (**Tabla 13**); la diferencia de miembros en cada genotipo se debe a que se enfatizó el criterio de zona geográfica sobre los demás, pues la prevalencia de VPH puede llegar a variar hasta 20 veces entre poblaciones de la misma región, según menciona (**de Sanjosé et al., 2007**) en su experimentación para la detección de VPH a nivel mundial desarrollada en base a análisis meta estadístico de edad estandarizada. No existe información genómica de variantes de

VPH que hayan sido estudiadas en el Ecuador en la plataforma del NCBI virus, por lo cual la investigación se extrapoló a información de secuencias genéticas del mismo entorno geográfico como Sur América.

**Tabla 27.**

*Secuencias de VPH*

HPV 16	HPV 18	HPV 45	HPV 58	HPV 31
HM057182.1	KU298886.1	KC470250.1	KU298920.1	KU298888.1
KP212150.1	KX514433.1	KC470251.1	KX514422.1	KU298889.1
KP212151.1		KC470252.1		KU298890.1
KP212152.1		KC470253.1		KX514424.1
KP212153.1		KC470254.1		KX514430.1
KP212154.1		KC470255.1		
KP212155.1		KC470256.1		
KP212156.1		KC470257.1		
KP212157.1		KC470258.1		
KP212158.1		KC470259.1		
KP212159.1		KC470260.1		
KP874716.1		LR861845.1		
KP874717.1		LR861941.1		
KP874718.1		LR862061.1		
KP874719.1				
KU298880.1				
KU298881.1				
KU298882.1				
KU298883.1				
KU298885.1				

**Nota.** Códigos GenBank clasificados en el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*)

En la tabla anterior (**Tabla 27**) se detallan los GenBank codes de las secuencias escogidas para el flanqueamiento de zonas conservadas entre secuencias, los cinco genotipos escogidos (16, 18, 45, 58 y 31) son los que según bibliografía y estudios poblacionales en el Ecuador son los de más alta prevalencia en el país (**Moya-Salazar & Rojas-Zumaran, 2017**) (**Carrión et al., 2020**) (**Rivera et al., 2018**) (**Falcón-Córdova & Carrero, 2021**).

### 3.2.2. Alineamientos múltiples

#### 3.2.2.1. Alineamiento global

Se realizaron alineamientos globales múltiples para las secuencias de cada uno de los genotipos con el fin de determinar la zona o gen más conservado, así como las diferencias entre las secuencias consenso de los cinco genotipos escogidos, comprobando los diferentes linajes a los que pertenecen (**Figura 14**). Los alineamientos globales buscan similitudes a través de toda la longitud de la secuencia sin discriminar algún nucleótido (**Nguyen et al., 2016**), por tal razón se utilizó el algoritmo Needleman-Wunch, mediante el cual se determinó a la zona del Gen L1 (5559 – 7154pb), como la zona gráficamente más conservada (**Fig. 15, 16, 17, 18, 19**), además, el gen L1 es un gen conservado utilizado para el análisis filogenético de variantes y genotipos de VPH (**Egawa & Doorbar, 2017**).

**Figura 14.**

*Alineamiento global múltiple de secuencias consenso de VPH*



**Nota.** Alineamiento global múltiple de secuencias consensos VPH Genotipos 16, 58, 18, 45, 58.

**Figura 15. Alineamiento global para secuencias de HPV 16**



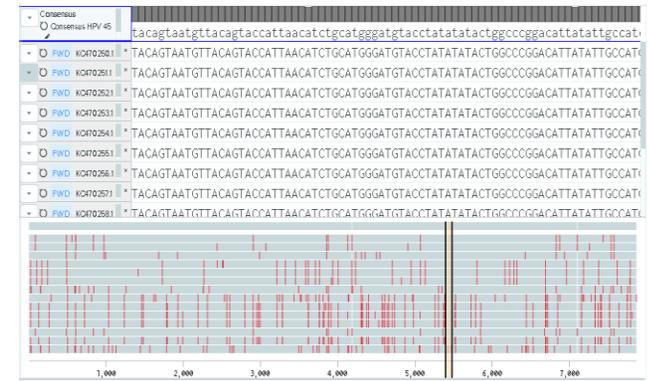
Fuente: Benchling

**Figura 16. Alineamiento global para secuencias de HPV 18**



Fuente: Benchling

**Figura 17. Alineamiento global para secuencias de HPV 45**



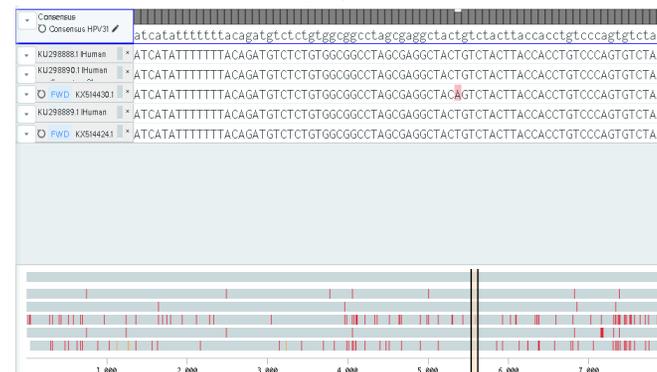
Fuente: Benchling

**Figura 18. Alineamiento global para secuencias de HPV 58**



Fuente: Benchling

**Figura 19. Alineamiento global para secuencias de HPV 31**



Fuente: Benchling

### 3.2.2.2. Alineamiento local

Una vez detectado al gen L1 como el más conservado, se extrajo la secuencia de nucleótidos de cada uno de los archivos genómicos y se realizó alineamiento local múltiple por genotipo, el algoritmo utilizado fue Smith-Waterman. Los algoritmos locales identifican segmentos relacionados que pudieron evolucionar de manera individual pero que mantienen un alto grado de similitud (Nguyen et al., 2016), de esta manera se pudo evidenciar la baja tasa de mutaciones del mencionado gen (Fig. 20, 21, 22, 23, 24). Así lo corrobora (Yang et al., 2022) en la construcción de una base de datos para el virus de VPH en China, la mayor tasa de mutaciones se encuentra en proteínas de tipo E6 (32%) y L1 (24%), sin embargo, el porcentaje de mutaciones sin sentido en E6 es del 54%, al contrario de L1 que posee un 28% de mutaciones no sinónimas Chen et al., (2016).

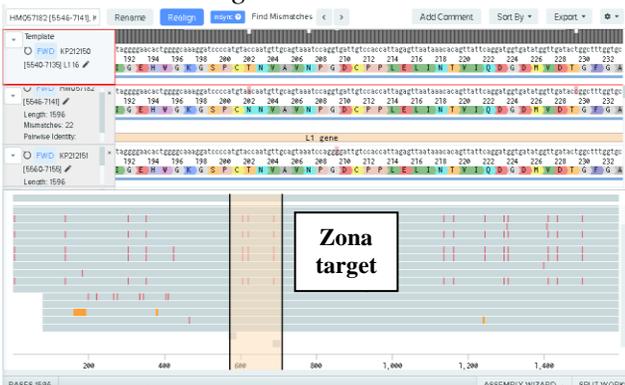
### 3.2.3. Diseño de Primers

El diseño de primers se enfocó en dos ámbitos la especificidad y la eficiencia de los cebadores en una PCR, en la **Tabla 28** se puede observar las secuencias, temperatura de melting ( $T_m$ ) y el tamaño del producto de PCR.

La longitud de los primers diseñados se encuentran entre 19-21pb con un contenido de CG de 55% la temperatura mínima de todo el set de 10 secuencias es de 54.17°C y el producto mínimo es de 136pb, estos parámetros se ajustan a los criterios óptimos del diseño de primers propuestos por (Dieffenbach et al., 1993) longitud >18pb,  $T_m$ >54°C y terminación GC en las 3 últimas bases del extremo 3'.

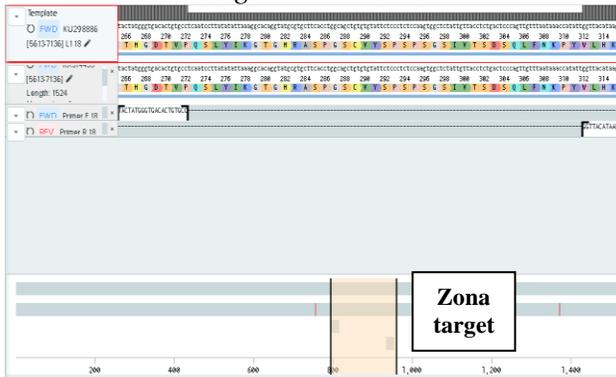
El set para HPV58 en este caso, no se ajusta al último criterio, sin embargo, el diseño de primers es orientado al diagnóstico clínico por lo cual tiene mayor fuerza el criterio de especificidad por encima del de eficiencia, (Dieffenbach et al., 1993) (Chuang et al., 2013)

**Figura 20.** Alineamiento local para secuencias de gen L1 HPV 16



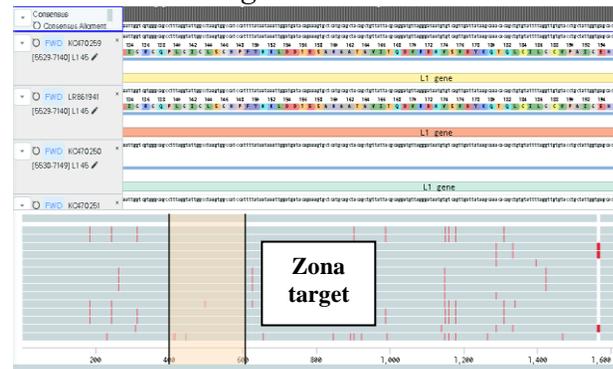
Fuente: Benchling

**Figura 21.** Alineamiento local para secuencias de gen L1 HPV 18



Fuente: Benchling

**Figura 22.** Alineamiento local para secuencias de gen L1 HPV 45



Fuente: Benchling

**Figura 23.** Alineamiento local para secuencias de gen L1 HPV 58



Fuente: Benchling

**Figura 24.** Alineamiento local para secuencias de gen L1 HPV 31



Fuente: Benchling

**Tabla 28.***Primers diseñados para genotipificación de VPH*

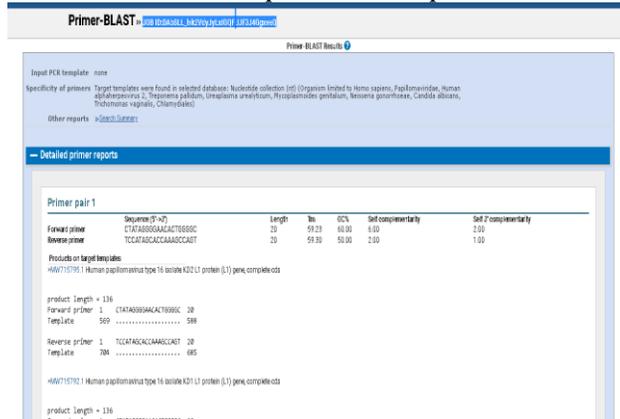
TYPE	Sequence (5' - 3')	Tm(°C)	Product Size (pb)
	F CTATAGGGGAACACTGGGGC	58.6	
HPV16	R TCCATAGCACCAAAGCCAGT	58.04	136
	F TACTATGGGTGACACTGTGCC	55.59	
HPV18	R ACCCTGTGCCTTATGTAACC	54.17	160
	F TTGGTTTGGGCATGTGTAGG	56.94	
HPV45	R TGTGCAGGTTTACAAAGTGTG	57.23	245
	F GGAGGACTGGCAATTTGGTTT	60.63	
HPV58	R CGTTTTAGTCTGGGCTTTGCT	59.22	249
	F ATTGACCACACCTCCCTCAG	56.72	
HPV31	R GTGCCCTATATCCTGCCTG	55.31	215

**3.2.4. Especificidad**

La especificidad de cada pareja de cebadores fue evaluada, mediante el software bioinformático PrimerBLAST. Aquí se incluyeron a los organismos patógenos de transmisión sexual descritos en la **Tabla 15**, y los genotipos de VPH que se evaluaron en esta experimentación. Los resultados se describen en las **Figuras 25, 26, 27, 28, 29**.

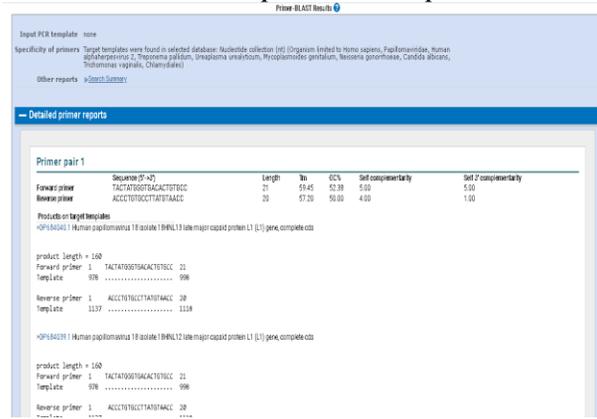
Además, realizó el ensayo de manera *in silico* con las secuencias de oligonucleótidos sintetizados para cada genotipo y el genoma consenso de cada genotipo en estudio, los resultados se describen en las **Figuras 30, 31, 32, 33, 34**.

**Figura 25. Reporte de especificidad de los cebadores para VPH Tipo 16**



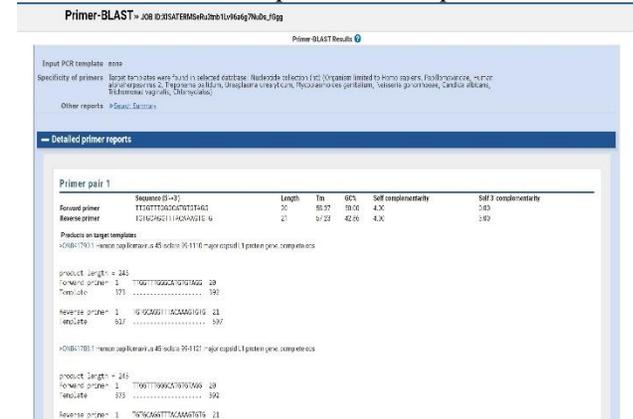
Fuente: PrimerBlast

**Figura 26. Reporte de especificidad de los cebadores para VPH Tipo 18**



Fuente: Primer Blast

**Figura 27. Reporte de especificidad de los cebadores para VPH Tipo 45**



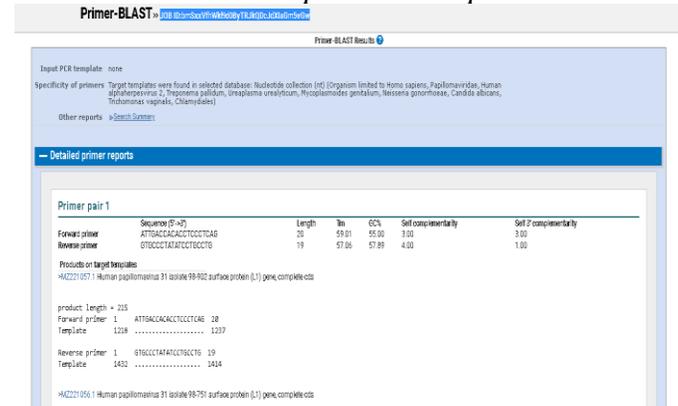
Fuente: Primer Blast

**Figura 28. Reporte de especificidad de los cebadores para VPH Tipo 58**



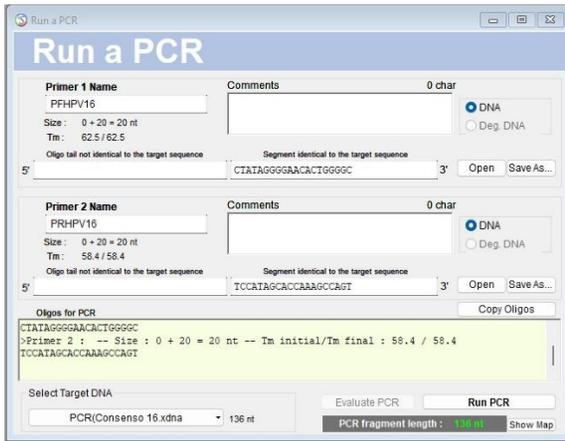
Fuente: PrimerBlast

**Figura 29. Reporte de especificidad de los cebadores para VPH Tipo 31**



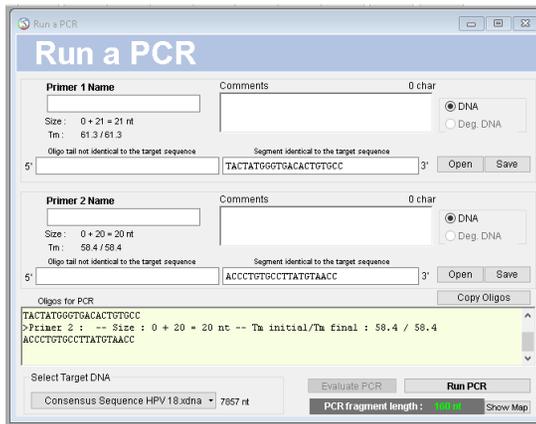
Fuente: PrimerBlast

**Figura 30. PCR in silico VPH Tipo 16**



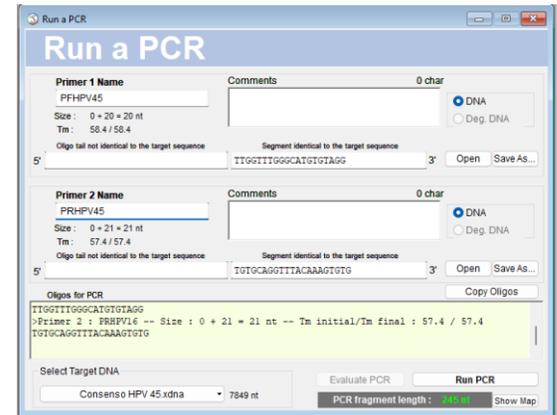
Fuente: Serial Cloner

**Figura 31. PCR in silico VPH Tipo 18**



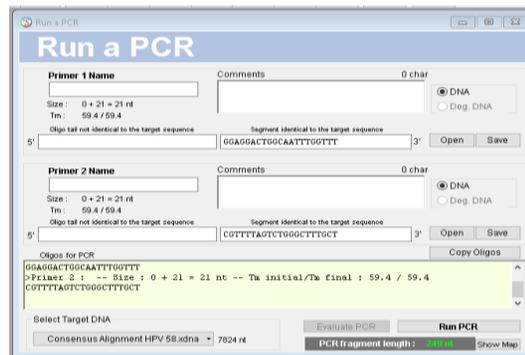
Fuente: Serial Cloner

**Figura 32. PCR in silico VPH Tipo 45**



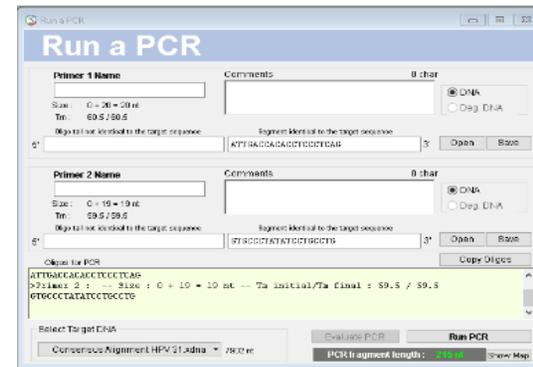
Fuente: Serial Cloner

**Figura 33. PCR in silico VPH Tipo 58**



Fuente: Serial Cloner

**Figura 34. PCR in silico VPH Tipo 31**



Fuente: Serial Cloner

### 3.3. Temperatura de Annealing (Ta)

Para la temperatura de annealing se probó un rango basado en los valores de Temperatura de Melting (Tm) que fueron proporcionados por el software de diseño de primers NetPrimer, la casa de síntesis de oligonucleótidos AZENTA y la calculadora de Tm de Thermofisher scientific (**Tabla 29**).

**Tabla 29.**

*Ta experimentales para cebadores de VPH*

TIPO	Tm (°C)				Tamaño producto (pb)
	Primer	Net Primer	Azenta	Thermofisher	
HPV16	F	58.60	64.0 (LS)	59.5	136
	R	58.04	60.0	57.8	
HPV18	F	55.59	57.8	60.8	160
	R	54.17	60.0	56.2	
HPV45	F	56.94	60.0	57.6	245
	R	57.23	53.9 (LI)	57.6	
HPV58	F	60.63	55.9	60.8	249
	R	59.22	55.9	60.0	
HPV31	F	56.72	62.0	59.0	215
	R	55.31	60.0	56.4	

**Nota.** F: Forward R: Reverse, LS: Límite Superior, LI: Límite Inferior

El gradiente de temperaturas fue establecido en base a los límites superior e inferior de los cebadores y la capacidad de variación de temperatura del equipo termociclador BIORAD CFX96 de LEM Ochoa, las temperaturas definidas, se describen en la **Tabla 30**.

Los componentes para cada muestra de este ensayo, así como el programa de termociclado se encuentran en el apartado 2.2.5.1 de la metodología, se cargaron ocho reacciones de 19

$\mu\text{L}$  de mastermix y  $1\mu\text{L}$  de ADN plantilla (Gen sintético) a una concentración de  $1 \times 10^{-6} \text{ ng}/\mu\text{L}$  (1 – 3 millones de copias) para cada genotipo en cada columna de la placa de PCR y en cada fila se aplicó una temperatura de annealing diferente (**Figura 35**). La concentración de ADN plantilla fue determinada en un primer ensayo de comprobación de reactivos, en el cual la concentración inicial marcaba un efecto significativo en la lectura de fluorescencia (**Anexo 6**).

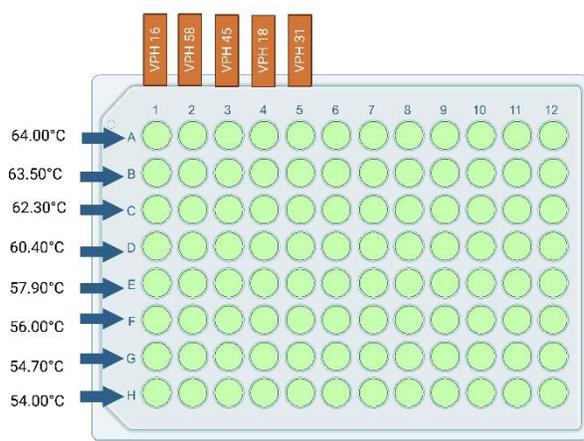
**Tabla 30.**

*Gradiente de temperaturas para Ta*

Fila	Temperatura (°C)
A	64.00
B	63.50
C	62.30
D	60.40
E	57.90
F	56.00
G	54.70
H	54.00

**Figura 35.**

*Placa de 96 pocillos para Ta*



Se realizaron dos repeticiones de este ensayo, y se analizaron las gráficas por genotipo de **VPH**, **Figuras 36, 37, 38, 39, 40**. La temperatura de annealing ( $T_a$ ) es una de las variables del test de PCR que debe ser resuelta antes de la aplicación a la experimentación objetivo, según **Sugiarti et al., (2021)**, una  $T_a$  demasiado baja da lugar a la formación de productos inespecíficos, y así mismo una  $T_a$  demasiado alta compromete el rendimiento de la PCR y en consecuencia la pureza del amplicón es baja, todo esto como consecuencia del deficiente annealing de los primers.

En la **Figura 36** se describe el ensayo de  $T_a$  en todo el gradiente de temperaturas, del genotipo VPH 16 existe amplificación en todo el rango de temperaturas, y resalta la figura A)

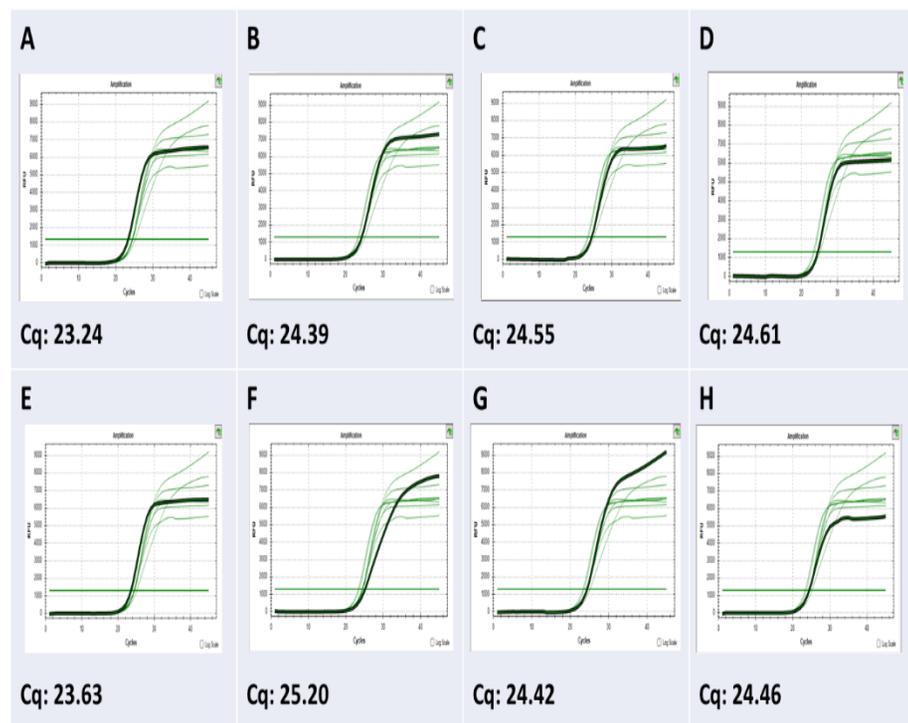
correspondiente a 64°C ya que posee la curva con el menor Cq de todos. Además, gráficamente se puede observar que no existe diferencias en las formas de las curvas de amplificación. Con respecto a los Cq de cada curva (**Tabla 31**), los datos son homogéneos, así lo denota la desviación estándar (SD) <0.85 y el coeficiente de varianza (CV) menor al 0.4. En ambas repeticiones (Cq1 y Cq2) la SD es 0.55 y 1.12 para cada una, por lo cual se puede inferir que los primers poseen la misma capacidad de hibridación en todo el rango de temperaturas, sin embargo, las temperaturas con el menor ciclo de amplificación se tomaron como las óptimas. La temperatura de hibridación óptima para VPH 16 es 64°C.

En la **Figura 37**, ensayo de Ta para el VPH 58, se puede observar que las curvas de amplificación son homogéneas para todas las temperaturas, la temperatura A) 64°C posee el menor Cq de todo el ensayo y se toma como la mejor temperatura para este ensayo, así mismo la SD <0.84 y CV <0.03 determina que los datos son homogéneos entre réplicas, y entre temperaturas con SD <0.10 y <0.78 (**Tabla 32**).

En la **Figura 38**, se describe el ensayo de Ta para el VPH 45, gráficamente existe un decrecimiento a nivel de amplitud de las curvas a partir de la sección D) correspondiente a 60.4°C, aun así, existe amplificación con Cq similares a las otras temperaturas (**Tabla 33**). El apartado D posee una gráfica con una curva mínima, esto se puede deber a una inconsistencia en el pipeteo, sin embargo, en la réplica 2 existe amplificación de esta curva, lo que corrobora el funcionamiento a dicha temperatura. Los datos son homogéneos con respecto a las repeticiones (SD <0.82, CV <0.04) y con respecto a las temperaturas (Cq1: 0.24 y Cq 0.21) (**Tabla 33**), es decir los primers son capaces de hibridar en todo el rango de temperaturas, sin embargo, se escogieron los Cq más tempranos. La temperatura de hibridación óptima para VPH 45 es 64°C.

**Figura 36.**

*Curvas de amplificación Ensayo Ta, VPH 16*



**Nota.** Curvas de amplificación para las temperaturas **A)** 64°C, **B)** 63.5°C, **C)** 62.3°C, **D)** 60.4 °C, **E)** 57.9°C **F)** 56°C **G)** 54.7°C **D)**54°C.

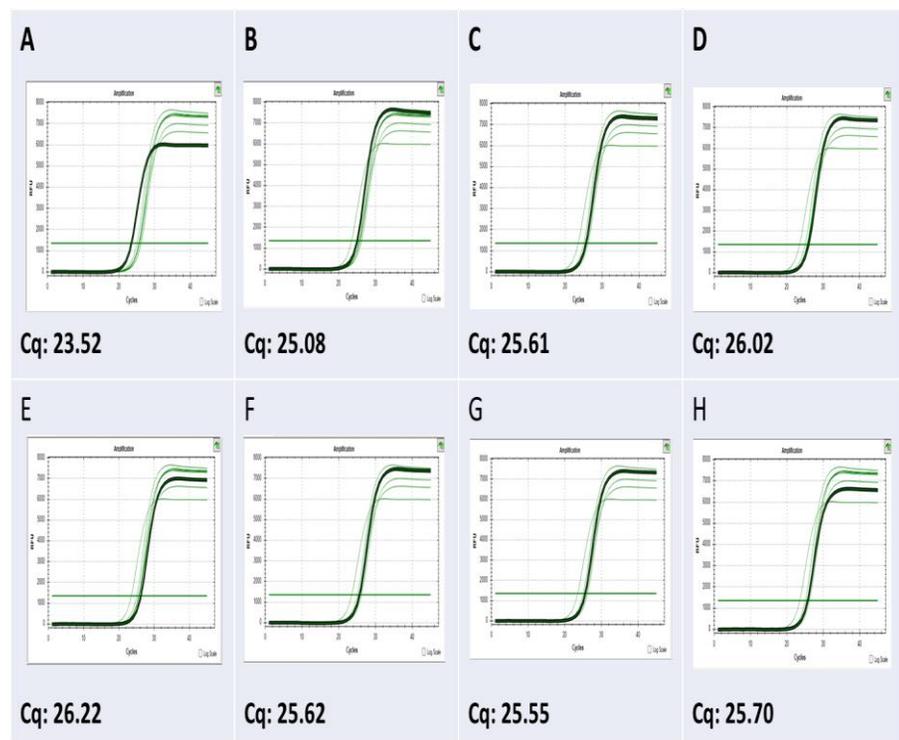
**Tabla 31.**

*Valores de Cq para el ensayo Ta. HPV 16*

	Temperaturas (°C)	Cq1	Cq2	Promedio Cq	SD	CV
A	64.00	23.34	21.64	22.49	0.85	0.04
B	63.50	24.39	25.17	24.78	0.39	0.02
C	62.30	24.55	24.25	24.40	0.15	0.01
D	60.40	24.61	25.09	24.85	0.24	0.01
E	57.90	23.63	24.99	24.31	0.68	0.03
F	56.00	25.20	24.98	25.09	0.11	0.00
G	54.70	24.42	24.90	24.66	0.24	0.01
H	54.00	24.46	25.11	24.79	0.32	0.01
<b>Promedio</b>		24.33	24.52			
<b>SD</b>		0.55	1.12			
<b>CV</b>		0.02	0.05			

**Figura 37.**

*Curvas de amplificación Ensayo Ta, VPH 58*



**Nota.** Curvas de amplificación para las temperaturas **A)** 64°C, **B)** 63.5°C, **C)** 62.3°C, **D)** 60.4 °C, **E)** 57.9°C **F)** 56°C **G)** 54.7°C **D)**54°C.

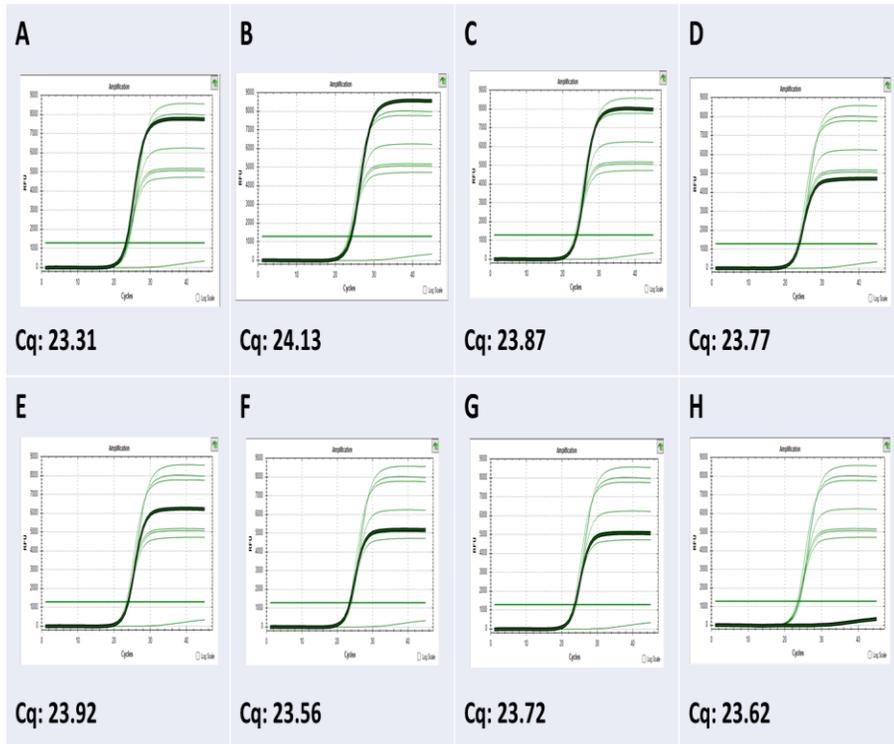
**Tabla 32.**

*Valores de Cq para el ensayo Ta. HPV 58*

	Temperaturas (°C)	R1	R2	Promedio	SD	CV
A	64.00	25.20	23.52	24.36	0.84	0.03
B	63.50	25.36	25.08	25.22	0.14	0.01
C	62.30	25.17	25.61	25.39	0.22	0.01
D	60.40	25.27	26.02	25.65	0.38	0.01
E	57.90	25.27	26.22	25.75	0.48	0.02
F	56.00	25.41	25.62	25.52	0.11	0.00
G	54.70	25.29	25.55	25.42	0.13	0.01
H	54.00	25.09	25.70	25.40	0.31	0.01
	<b>Promedio</b>	25.26	25.42			
	<b>SD</b>	0.10	0.78			
	<b>CV</b>	0.00	0.03			

**Figura 38.**

*Curvas de amplificación Ensayo Ta, VPH 45*



**Nota.** Curvas de amplificación para las temperaturas A) 64°C, B) 63.5°C, C) 62.3°C, D) 60.4 °C, E) 57.9°C F) 56°C G) 54.7°C D)54°C.

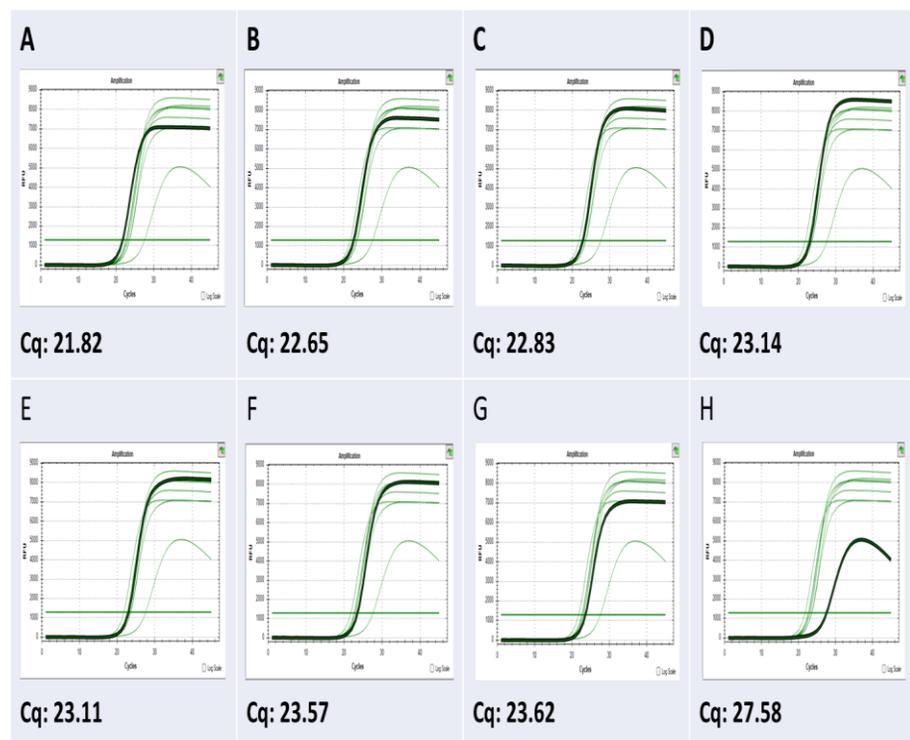
**Tabla 33.**

*Valores de Cq para el ensayo Ta. HPV 45*

	Temperaturas (°C)	Cq1	Cq2	Promedio Cq	SD	CV
A	64.00	23.35	24.81	24.08	0.73	0.03
B	63.50	24.17	25.09	24.63	0.46	0.02
C	62.30	23.92	25.18	24.55	0.63	0.03
D	60.40	23.83	25.10	24.47	0.64	0.03
E	57.90	23.98	25.49	24.74	0.75	0.03
F	56.00	23.62	25.45	24.54	0.91	0.04
G	54.70	23.78	25.40	24.59	0.81	0.03
H	54.00	23.62	25.27	24.45	0.82	0.03
	<b>Promedio</b>	23.78	25.22			
	<b>SD</b>	0.24	0.21			
	<b>CV</b>	0.01	0.01			

**Figura 39.**

*Curvas de amplificación Ensayo Ta, VPH 18*



**Nota.** Curvas de amplificación para las temperaturas **A)** 64°C, **B)** 63.5°C, **C)** 62.3°C, **D)** 60.4 °C, **E)** 57.9°C **F)** 56°C **G)** 54.7°C **D)**54°C.

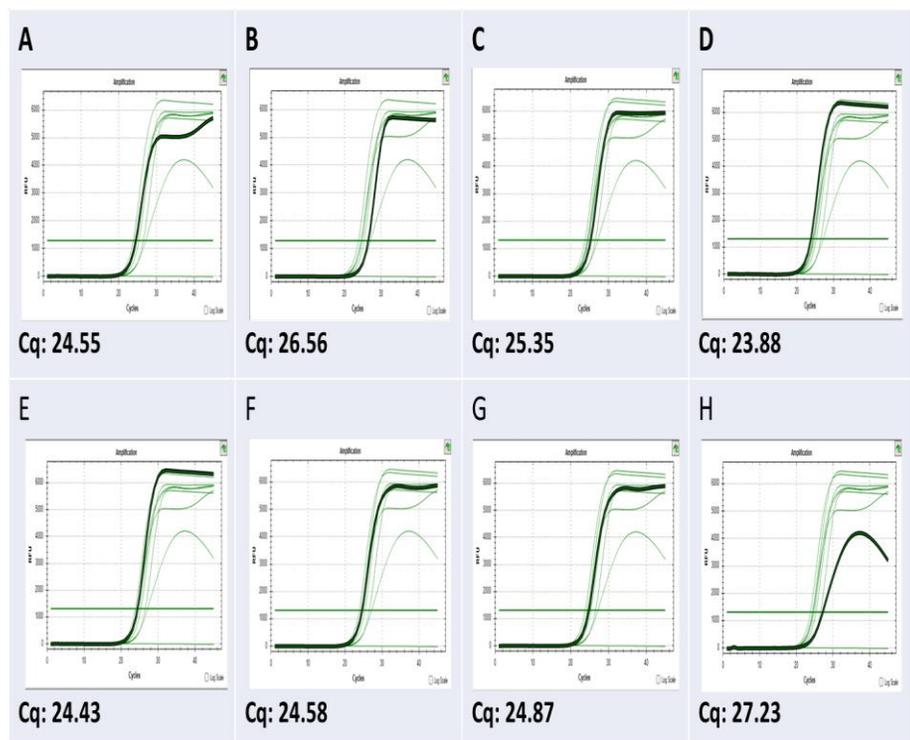
**Tabla 34.**

*Valores de Cq para el ensayo Ta. VPH 18*

Temperaturas (°C)	Cq1	Cq2	Promedio Cq	SD	CV
64.00	21.82	22.58	22.20	0.38	0.02
63.50	22.65	24.05	23.35	0.70	0.03
62.30	22.83	24.25	23.54	0.71	0.03
60.40	23.14	24.49	23.82	0.67	0.03
57.90	23.11	23.39	23.25	0.14	0.01
56.00	23.57	24.62	24.10	0.53	0.02
54.70	23.62	24.98	24.30	0.68	0.03
54.00	27.58	25.10	26.34	1.24	0.05
<b>Promedio</b>	23.54	24.18			
<b>SD</b>	1.62	0.79			
<b>CV</b>	0.07	0.03			

**Figura 40.**

*Curvas de amplificación Ensayo Ta, VPH 31*



**Nota.** Curvas de amplificación para las temperaturas **A)** 64°C, **B)** 63.5°C, **C)** 62.3°C, **D)** 60.4 °C, **E)** 57.9°C **F)** 56°C **G)** 54.7°C **D)**54°C.

**Tabla 35.**

*Valores de Cq para el ensayo Ta. VPH 31*

Temperatura (°C)	Cq1	Cq2	Promedio Cq	SD	CV
64.00	24.55	29.59	27.07	2.52	0.09
63.50	26.56	29.53	28.05	1.49	0.05
62.30	25.35	29.61	27.48	2.13	0.08
60.40	23.88	28.49	26.19	2.31	0.09
57.90	24.43	28.72	26.58	2.15	0.08
56.00	24.58	32.35	28.47	3.88	0.14
54.70	24.87	29.02	26.95	2.08	0.08
54.00	27.23	28.03	27.63	0.40	0.01
<b>Promedio</b>	25.18	29.42			
<b>SD</b>	1.07	1.23			
<b>CV</b>	0.04	0.04			

En la **Figura 39** se describe el ensayo de Ta para el VPH 18, gráficamente las curvas poseen forma y amplitud similar en todo el rango de temperatura, excepto en H) 54°C, esta temperatura no es la ideal para hibridación de VPH 18 pues posee el Cq más tardío de todo el ensayo además de no poseer una zona plateau. Con respecto a los valores de Cq (**Tabla 34**) entre repeticiones la temperatura H) posee SD >1 por lo cual no se considera una temperatura confiable, así mismo el SD entre temperaturas es >1.62 en Cq1, es decir los Cq entre temperaturas no son homogéneos. La temperatura de hibridación óptima para VPH 18 es 64°C.

En la **Figura 40**, se detallan las curvas de amplificación para el ensayo de Ta del VPH 31, las curvas comparten son gráficamente similares a excepción de la curva probada en la temperatura H) 54°C, posee un Ct tardío y no posee zona de plateau por esta razón, se la considera la menos eficiente para la amplificación de HPV 31. Además, la SD (**Tabla 35**) de este genotipo está por encima de 1, los datos nos son homogéneos y se debe establecer una temperatura o un rango de dos temperaturas para la amplificación del genotipo. La temperatura de hibridación óptima según el Cq para VPH 31 es 60.4°C.

El promedio de los Cq para cada variación de calor se describe en la **Figura 41**, el mapa de calor realizado indica las temperaturas a la que los cebadores de cada genotipo tienen mayor efecto en el proceso de PCR. En base al gráfico, se puede determinar que la temperatura de 64°C es la óptima para la hibridación de cebadores de los genotipos 16, 58, 45 y 18 (Cqs homogéneos), sin embargo, para el genotipo 31 con datos de Cq más dispersos la temperatura óptima es 60.4°C, las temperaturas coinciden con el postulado de (**Sugiarti et al., (2021)**) que argumentan que deben estar próximas a la temperatura de melting en un rango de  $\pm 5^\circ\text{C}$ .

**Figura 41.**

*Mapa de calor para la temperatura de annealing del VPH*

Temperatura (°C)	HPV 16	HPV 58	HPV 45	HPV 18	HPV 31
64.00	22.49	24.36	24.08	22.20	27.07
63.50	24.78	25.22	24.63	23.35	28.05
62.30	24.40	25.39	24.55	23.54	27.48
60.40	24.85	25.65	24.47	23.82	26.19
57.90	24.31	25.75	24.74	23.25	26.58
56.00	25.09	25.52	24.54	24.10	28.47
54.70	24.66	25.42	24.59	24.30	26.95
54.00	24.79	25.40	24.45	26.38	27.63

**Nota. Verde:** Amplificación temprana, **Rojo:** Amplificación tardía

En un análisis en conjunto, se establece que las temperaturas de annealing  $\geq 60.4^{\circ}\text{C}$  son las más eficientes para la prueba de genotipificación de PCR, según **Silalahi et al., (2021)**, una baja temperatura de melting produce una falsa hibridación del primer, mientras que temperaturas sobre la óptima produce que el primer no se pegue al ADN y por lo tanto no existe el proceso de PCR, en el ensayo existe amplificación, por lo cual se puede aumentar la misma sobre el rango de  $60^{\circ}\text{C}$  que según **ThermoFisher scientific, (2023)** es la temperatura de annealing óptima a nivel universal. Así mismo **Obradovic et al., (2013)**, en su ensayo de optimización de PCR con promotores EFGR, estableció temperaturas óptimas superiores ( $61^{\circ}\text{C}$ ) al  $T_m$  calculado ( $56^{\circ}\text{C}$ ) atribuyendo esto, al alto contenido de GC del ADN plantilla.

### 3.4. Tiempo de Annealing (ta)

Para el tiempo de annealing se probaron 2 variables de tiempo en el programa de termociclado, 30 segundos, y 15 segundos según la enzima. Los componentes de cada muestra de ensayo y el programa de termociclado se encuentra en la sección 2.2.5.2 de la metodología

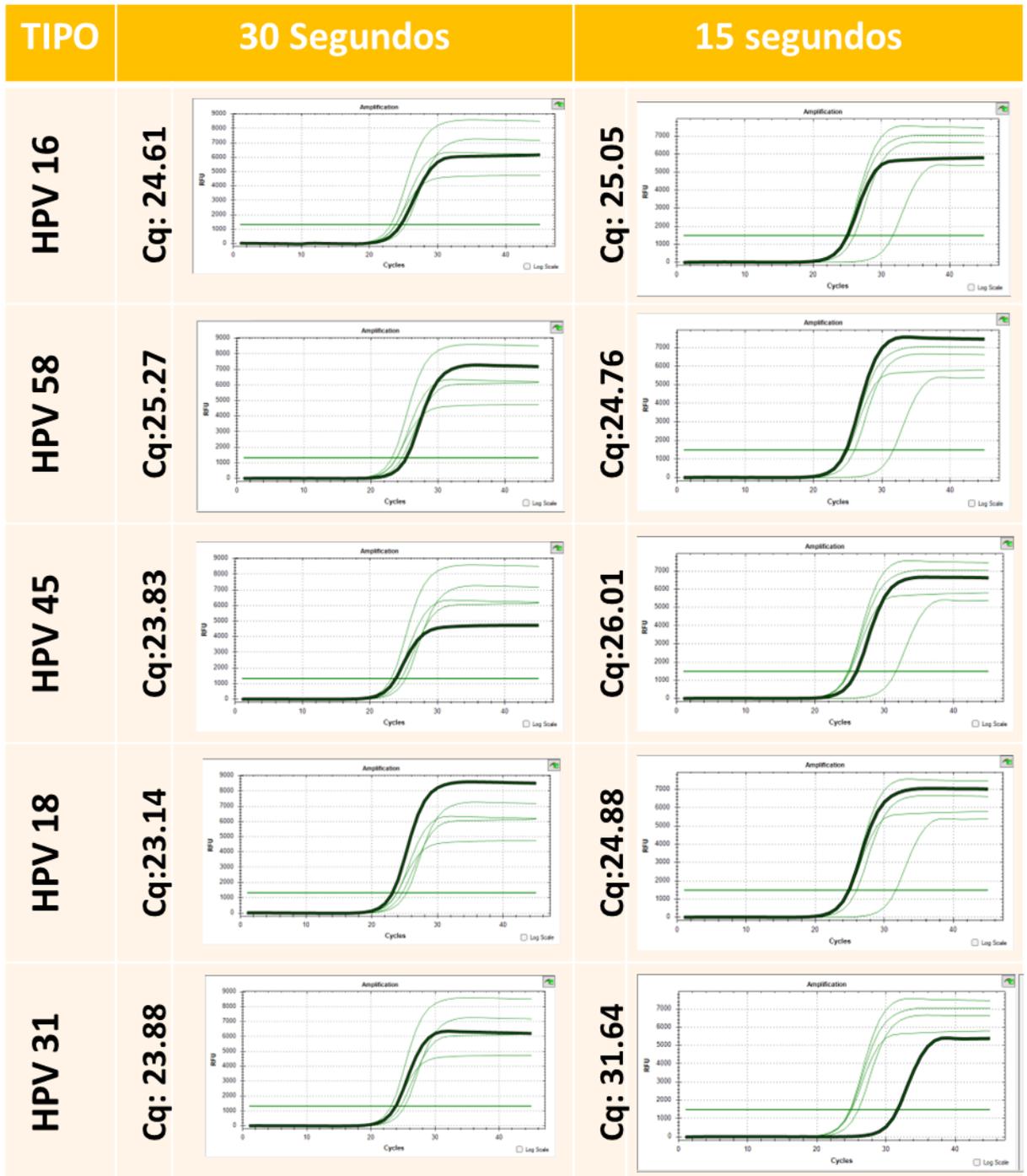
Para este ensayo se utilizaron las temperaturas anteriormente determinadas. En la **Figura 42** se observa las curvas de amplificación para cada genotipo, gráficamente no poseen diferencias en su forma y amplitud en los dos tiempos de annealing probados. Los datos de Cq para cada repetición son homogéneos a excepción del genotipo 31 que posee SD de 2.305 y 0.915 para los ensayos de 30 y 15 segundos respectivamente (**Tabla 36 y 37**), se asume un error en el pipeteo.

En la **Tabla 38** se describen los promedios de cada tiempo de annealing para cada genotipo, el tiempo de annealing con Cq más temprano es el de 30 segundos a excepción del genotipo 58 que varía en  $<0.5$  ciclos. En un análisis en conjunto el tiempo de 30 segundos representa ser el mejor parámetro de acuerdo con los Cq, sin embargo, según **Lo et al., (2006)**, afirma que si la temperatura de annealing de los cebadores es  $>60^{\circ}\text{C}$  se puede combinar el paso de annealing con el de extensión en un ciclo de PCR de dos pasos.

El tiempo de annealing utilizado con mayor frecuencia es de 30-45 segundos, un incremento en el tiempo de annealing en muchos casos hasta 2 o 3 minutos, por ejemplo, no influencia significativamente en el proceso de la PCR, al contrario, un largo periodo de annealing, puede incurrir en la aparición de productos inespecíficos, debido a la actividad reducida de algunas polimerasas en el rango de temperatura de 45 a  $60^{\circ}\text{C}$  (**Caister Academic Press, 2023**). Debido a esto en los próximos ensayos se utilizará el tiempo de 15 segundos con la posibilidad de fusionar el tiempo de annealing con el de extensión de la enzima BlasTaq.

Figura 42.

Curvas de amplificación para el ensayo tiempo de annealing ( $t_a$ ) del VPH



**Tabla 36.***Valores de Cq para el ensayo de 30 segundos*

<b>Genotipo</b>	<b>Cq1</b>	<b>Cq2</b>	<b>Promedio</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
<b>(Cq)</b>					
HPV 16	24.61	25.09	24.85	0.24	0.01
HPV 58	25.27	26.02	25.65	0.375	0.01
HPV 45	23.83	25.1	24.47	0.635	0.03
HPV 18	23.14	24.49	23.82	0.675	0.03
HPV 31	23.88	28.49	26.19	2.305	0.09

**Tabla 37.***Valores de Cq para el ensayo de 15 segundos*

<b>Genotipo</b>	<b>Cq1</b>	<b>Cq2</b>	<b>Promedio</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
<b>(Cq)</b>					
HPV 16	25.05	25.86	25.46	0.405	0.02
HPV 58	24.76	25.35	25.06	0.295	0.01
HPV 45	26.01	26.18	26.10	0.085	0.00
HPV 18	24.88	25.29	25.09	0.205	0.01
HPV 31	31.64	33.47	32.56	0.915	0.03

**Tabla 38.***ta 30 segundos vs. ta 15 segundos.*

<b>Genotipo</b>	<b>30 segundos</b>	<b>15 segundos</b>
HPV 16	24.85	25.46
HPV 58	25.65	25.06
HPV 45	24.47	26.10
HPV 18	23.82	25.09
HPV 31	26.19	32.56

### 3.5. Concentración de Primer ([P])

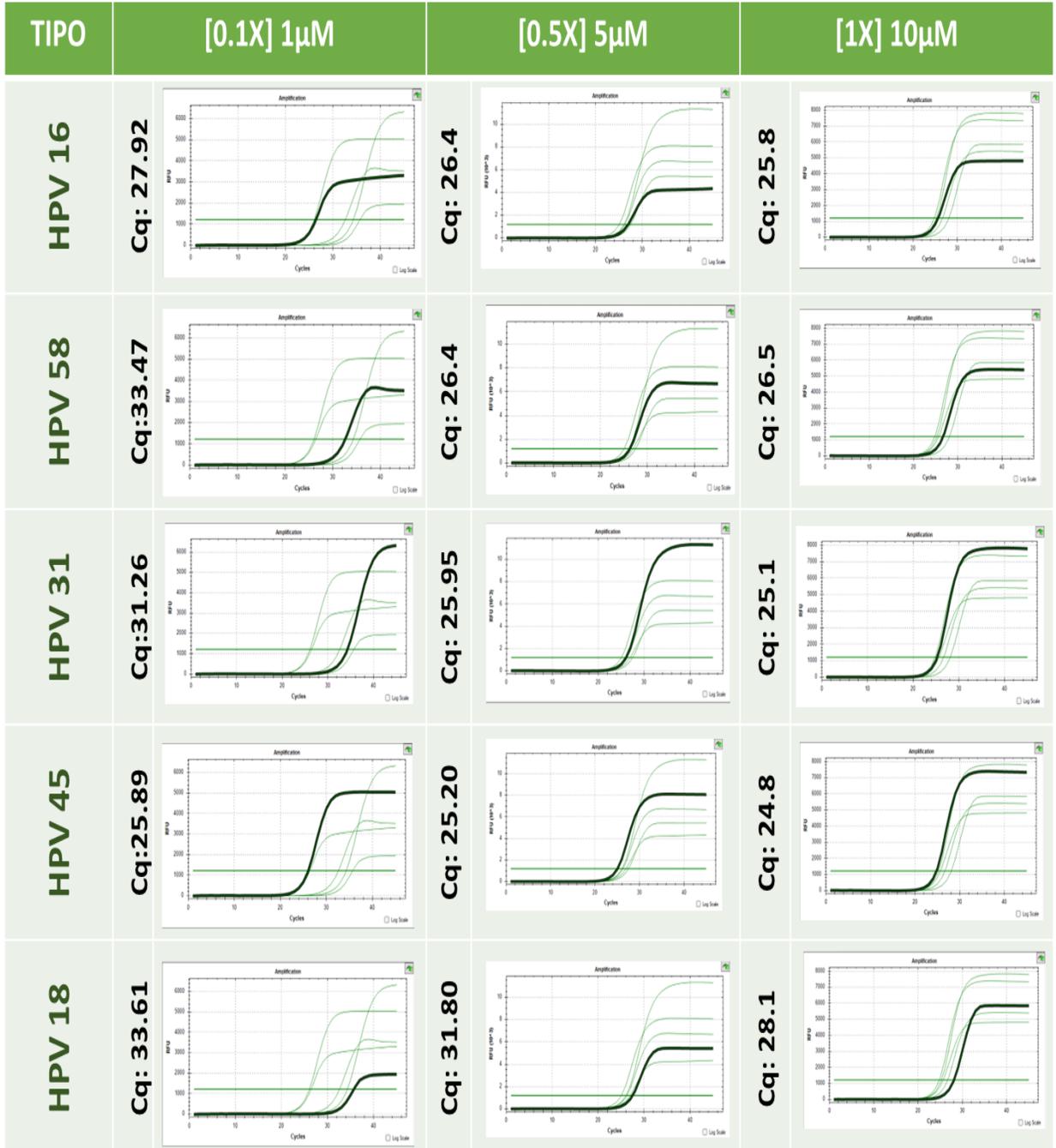
En este ensayo se variaron tres concentraciones de primers para la reacción, se probaron concentraciones de 1X (10 $\mu$ M), 0.5X (5 $\mu$ M) y 0.1X (1 $\mu$ M) en busca de la cantidad óptima a utilizar en el ensayo de genotipificación, la concentración de primer recomendada para los ensayos de PCR se encuentra entre 0.1 $\mu$ M y 1  $\mu$ M (Altshuler, 2006), sin embargo, en fragmentos diana de menor tamaño que rondan los 100pb puede ser necesario una mayor cantidad de primer, superior a 1 $\mu$ M (Oswald & Kennedy, 2011), por esta razón se probó concentraciones superiores a las recomendadas.

Las curvas de amplificación (**Figura 43**) presentan una mayor amplitud en la concentración de 1X a nivel general, sin embargo, la zona de plateau de las curvas son más prolongadas a dicha concentración. La zona de plateau representa el decrecimiento significativo de la hibridación de primers con respecto al ADN plantilla debido al exceso de producto formado y la insuficiente cantidad de enzima para la amplificación (Lo et al., 2006), al existir una zona plateau más temprana y prolongada da indicios que la concentración de primer está en exceso, ya que el número de moléculas de primer es proporcional al de ADN plantilla para la amplificación (Applied Biosystems, 2022), sugiriendo así la reducción de ésta.

Los datos de Cq para cada concentración de primer se describen en las **Tablas 39, 40 y 41**, los datos de desviación estándar sugieren que los datos son homogéneos a concentración de 1X y 0.5X de primer, a excepción del genotipo 31. Para el ensayo a concentración de 0.1X los datos no son totalmente homogéneos para las repeticiones SD>1, sin embargo, presentan amplificación y zona de plateau menos prolongada (**Figura 43**), lo cual representa equidad entre concentración de primer y ADN plantilla (Life Technologies Corporation, 2012).

**Figura 43.**

*Curvas de amplificación para el ensayo concentración de primer*



**Tabla 39.***Valores de Cq para la concentración de primer 0.1X*

<b>Genotipo</b>	<b>Cq1</b>	<b>Cq2</b>	<b>Promedio (Cq)</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
HPV 16	26.39	29.44	27.92	1.53	0.055
HPV 58	32.56	34.38	33.47	0.91	0.027
HPV 45	34.26	28.25	31.26	3.01	0.096
HPV 18	26.05	25.72	25.89	0.17	0.006
HPV 31	35.68	31.53	33.61	2.08	0.062

**Tabla 40.***Valores de Cq para la concentración de primer 0.5X*

<b>Genotipo</b>	<b>Cq1</b>	<b>Cq2</b>	<b>Promedio (Cq)</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
HPV 16	26.96	25.83	26.40	0.57	0.021
HPV 58	26.24	26.55	26.40	0.16	0.006
HPV 45	26.06	25.83	25.95	0.12	0.004
HPV 18	25.04	25.35	25.20	0.16	0.006
HPV 31	27.46	34.7	31.08	3.62	0.116

**Tabla 41.***Valores de Cq para la concentración de primer 1x*

<b>Genotipo</b>	<b>Cq1</b>	<b>Cq2</b>	<b>Promedio Cq</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
HPV 16	25.61	26.07	25.8	0.23	0.009
HPV 58	26.62	26.44	26.5	0.09	0.003
HPV 45	25.22	25.01	25.1	0.10	0.004
HPV 18	24.75	24.88	24.8	0.06	0.003
HPV 31	28.08	28.02	28.1	0.03	0.001

En la **Tabla 42**, se compara el promedio de los Cq para cada concentración de primers, a nivel general, las concentraciones de 1X y 0.5X no varían en más de un ciclo en todos los genotipos a diferencia que en el ensayo con 0.1X. Se puede escoger a la concentración de 0.5X (5 $\mu$ M) como la mejor experimentalmente debido a que posee el Cq más bajo y no tiene mayor variación con 1X, sin embargo, según (**Altshuler, 2006**) si los primers poseen la capacidad de formación de dímeros, una alta concentración de estos incurre en la amplificación de oligómeros de cebadores, además de la creación de productos inespecíficos de PCR, por esta razón es justificable bajar la concentración en los próximos ensayos.

**Tabla 42.**

*Valor promedio de Cq para cada concentración de primer*

<b>Genotipo</b>	<b>0.1X</b>	<b>0.5X</b>	<b>1X</b>
HPV 16	27.92	26.40	25.84
HPV 58	33.47	26.40	26.53
HPV 45	31.26	25.95	25.12
HPV 18	25.89	25.20	24.82
HPV 31	33.61	31.08	28.05

### **3.6. Número de ciclos**

No fue necesario variar el número de ciclos debido a que los controles amplifican antes del ciclo 40, reiterando el rango de amplificación de los controles, es decir entre el ciclo 15 hasta 40 ciclos. Según **Kadri, (2020)** para 0.1 $\mu$ g de ADN genómica alrededor de 20 a 40 ciclos son suficientes para obtener una cantidad de ADN medible, así mismo, elevar el número de ciclos sobre los 40, tiende a generar productos inespecíficos por la alta cantidad de ADN, dNTPs y energía que se ha aplicado durante la PCR (**Tamay de Dios et al., 2013**). Se trabajó en un principio con 45 ciclos, debido a que los primers son de

características experimentales y se debía asegurar la hibridación de los cebadores, así como el objetivo de amplificación, sin embargo, luego de los ensayos realizados se optó usar como límite máximo 40 ciclos de amplificación.

### 3.7. Identificación del Background

Para la identificación del background o ruido, se probaron reacciones de cada componente de la reacción (**Figura 44**) con el fin de determinar la fluorescencia que emitían los mismos y poder discriminar amplificación, ruido y posibles productos inespecíficos.

**Figura 44.**

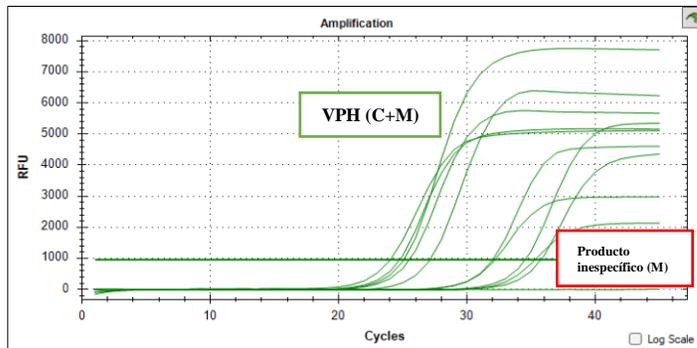
*Esquema para la disposición de muestras del background*

C16 + M16	C58 + M58	C45 + M45	C18 – M18	C31 + M31
M16	M58	M45	M18	M31
E	E	E + H <sub>2</sub> O	E + H <sub>2</sub> O	C-
C16	C58	C45	C18	C31

**Nota.** C: Control, M: Mastermix, E: BlasTaq Mix, H<sub>2</sub>O: Agua.

La identificación de Background es necesaria en la mayoría de los ensayos de optimización, sirve para establecer los límites de C<sub>q</sub> o límites de cuantificación (**Applied Biosystems, 2022**) en el caso de esta experimentación el límite de detección de la fase exponencial, además este ensayo se combinó para identificar productos inespecíficos. Se probó la esquemización descrita previamente (**Figura 45**), la enzima (E) no amplificó y la fluorescencia emitida está por debajo de la línea de threshold, así como los controles para cada uno de los VPH.

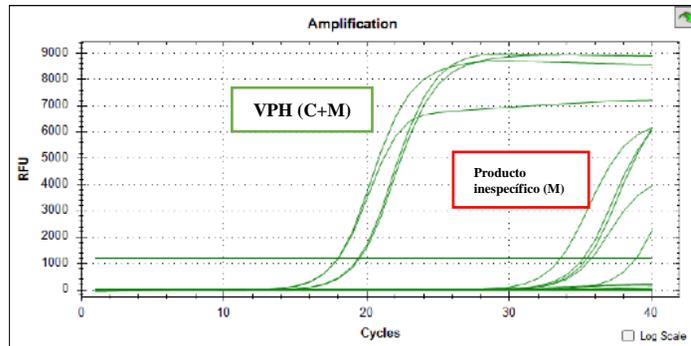
Programa 1



**Figura 45.** Programa 1 Background.

El ensayo se corrió con las condiciones **Ta:** 60.4°C [**P:** 0.5X, El primer conjunto de curvas corresponde a la amplificación del VPH 16, 58, 45, 18, 31. El segundo conjunto de curvas son productos inespecíficos por la reacción de los oligonucleótidos en el Mastermix (M). **Fuente:** CFX96 Manager

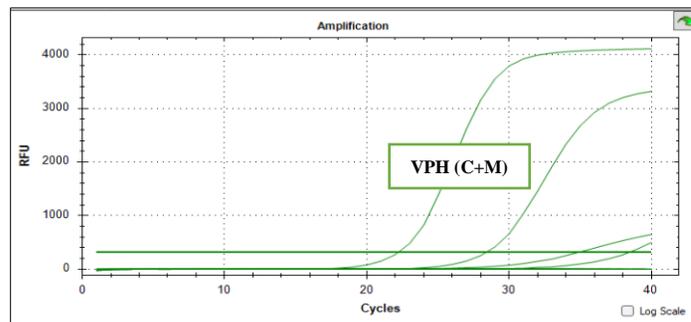
Programa 2



**Figura 46.** Programa 2 Background.

El ensayo se corrió con las condiciones **Ta:** 64°C [**P:** 0.5X, El primer conjunto de curvas corresponde a la amplificación del VPH 16, 58, 45, 18, 31. El segundo conjunto de curvas son productos inespecíficos por la reacción de los oligonucleótidos en el Mastermix (M). **Fuente:** CFX96 Manager

Programa 3



**Figura 47.** Programa 3 Background.

El ensayo se corrió con las condiciones **Ta:** 64°C [**P:** 0.05X, El conjunto de curvas corresponde a la amplificación del VPH 16, 58, 45, 18, 31. **Fuente:** CFX96 Manager

En la **Figura 45** se corrió el ensayo y se observaron dos grupos de curvas, el primero corresponde a la amplificación de producto específico (Gen L1 VPH 16/58/45/18/31) se encuentran entre los Cq 24.03 y 27.11 y el segundo grupo que se encuentra entre 32.02 y 35.76, este último son productos inespecíficos, pues según **Dnasoftware, (2015)**, los dímeros de primers frecuentan aparecer en ciclos >35, sin embargo, el apareamiento de amplificación prematura Cq:32.02 se debe a la alta concentración de primer 0.5X (5 $\mu$ M).

En la **Figura 46** se observa la amplificación del programa 2, con la corrección de temperatura de annealing a 64°C, como se determinó anteriormente en el ensayo de Ta (**Figura 41**) y se mantuvo la [P], el aumento de temperatura hace que la hibridación de los primers sea más compleja, si es cercana a la fase de desnaturalización haría que los primers no hibriden y o que no amplifiquen (**BIORAD, 2023a**). Se observó entonces una disminución de la amplificación de productos inespecíficos hasta el ciclo 35.18 – 38.89.

En la **Figura 47** se corrigió la concentración de primer, se realizó una dilución 0.05X(0.5 $\mu$ M). Se trabajó a Ta de 64°C y la concentración de ADN plantilla a 10<sup>-6</sup> ng/ $\mu$ L. Se eliminó el ruido o amplificación inespecífica por parte de los primers, y se observó un solo patrón de curvas correspondiente al gen L1 de cada genotipo, el genotipo 31 no amplificó, esto se debe al factor de dilución que se está utilizando para el ADN plantilla. La concentración de primer óptima según (**BIORAD, 2023a**) en sus ensayos es de 0.2 $\mu$ M - 1 $\mu$ M y un exceso de esta concentración incide en la aparición de productos inespecíficos debido a la alta cantidad de energía que le otorga la PCR, lo que se corroboró en el ensayo.

### **3.8. Protocolo para genotipificación de VPH**

Con las condiciones anteriores se dió paso a la creación del protocolo *in house* para la detección de variantes 16, 58, 45, 18 y 31 (**Tabla 43 y 44**) que fue diseñado para condiciones y equipos del departamento de Biología Molecular del LEM Ochoa

**Tabla 43.***Componentes de la RT-PCR para el protocolo de Genotipificación de VPH*

<b>Componentes</b>	<b>Concentración Final</b>	<b>Volumen Final (<math>\mu</math>L)</b>
Polimerasa BlasTaq™ 2X qPCR MasterMix	1X	10
H <sub>2</sub> O Grado PCR ROCHE®	--	4
Primer Forward	0.5 $\mu$ M	2
Primer Reverse	0.5 $\mu$ M	2
ADN	0.05 pg./ $\mu$ L ADN sintético	2
Volumen total	--	20

**Tabla 44.***Programa de termociclado para el protocolo de Genotipificación de VPH*

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
Desnaturalización inicial	95°C	3 min.	1
Desnaturalización	95°C	15 s	40
Hibridación	64°C	15 s	40
Extensión / Lectura	60°C	45 s	40
Mantenimiento	4	$\infty$	--

### 3.9.Sensibilidad

Para la sensibilidad del método se realizaron diluciones seriadas de cada control de VPH con un factor de dilución 1:10, se realizaron cinco diluciones seriadas para cada genotipo (**Tabla 45**), se instauró la PCR de acuerdo con la formulación ya establecida en el protocolo.

**Tabla 45.**

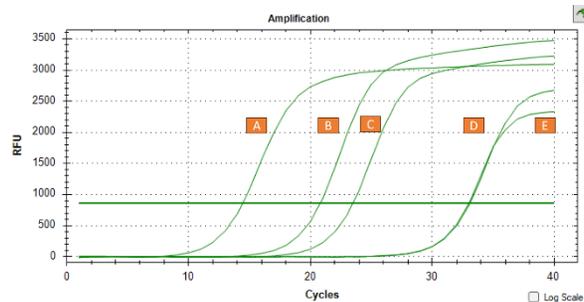
*Diluciones para cada control de VPH*

<b>Genotipo</b>	<b>Diluciones (ng/μL)</b>				
VPH 16	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
VPH 58	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
VPH 45	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-11</sup>
VPH 18	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-11</sup>
VPH 31	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>

En la **Tabla 46**. Se establece el ensayo de diluciones para cada variante de VPH, los genotipos 58 y 31 poseen su límite inferior en la dilución 10<sup>-7</sup> ng/μL (**Figura 49**) y 10<sup>-6</sup> ng/μL (**Figura 50**), se puede observar una relación curva-dilución gráficamente y como la cantidad de ADN plantilla influye en el ciclo de cuantificación (Cq)

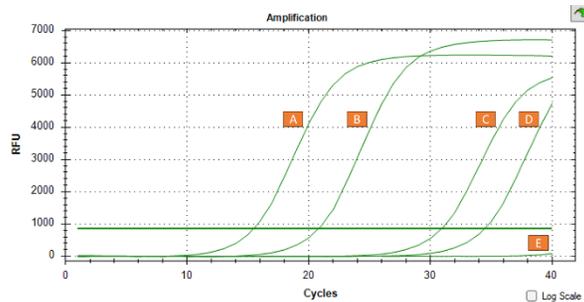
**Tabla 46.** Curvas de Amplificación para las Diluciones de VPH

**Figura 48.** Diluciones VPH 16



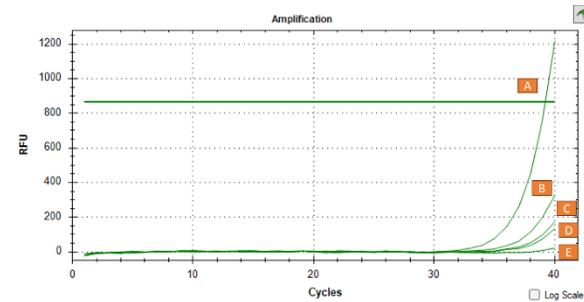
**Nota.** **A)**  $10^{-3}$  ng/μL (Cq:14.45), **B)**  $10^{-4}$  ng/μL (Cq:20.81) **C)**  $10^{-5}$  ng/μL (Cq: 23.49) **D)**  $10^{-6}$  ng/μL (Cq: 33.02) **E)**  $10^{-7}$  ng/μL (Cq: 33.11). **Fuente:** CFX96 Manager

**Figura 49.** Diluciones VPH 58



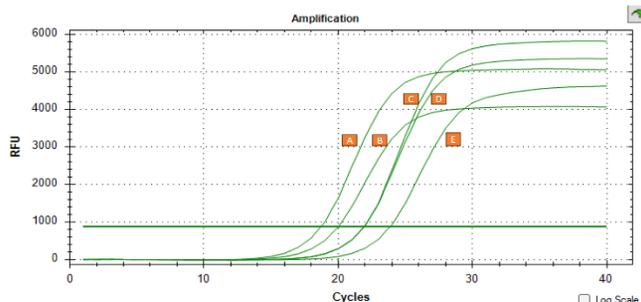
**Nota.** **A)**  $10^{-3}$  ng/μL (Cq:15.47), **B)**  $10^{-4}$  ng/μL (Cq:20.82) **C)**  $10^{-5}$  ng/μL (Cq: 30.97) **D)**  $10^{-6}$  ng/μL (Cq: 34.47) **E)**  $10^{-7}$  ng/μL (Cq: N/A). **Fuente:** CFX96 Manager

**Figura 50.** Diluciones VPH 31



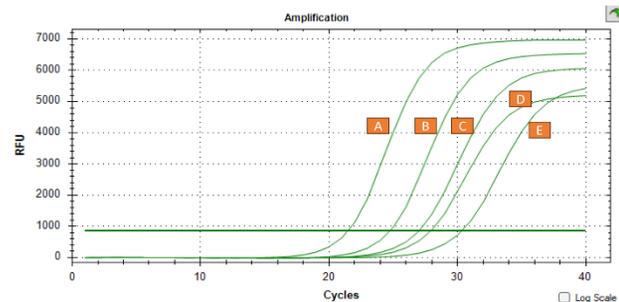
**Nota.** **A)**  $10^{-2}$  ng/μL (Cq:34.30), **B)**  $10^{-3}$  ng/μL (Cq:37.86) **C)**  $10^{-4}$  ng/μL (Cq: 38.82) **D)**  $10^{-5}$  ng/μL (Cq: 36.57) **E)**  $10^{-6}$  ng/μL (Cq: N/A). **Fuente:** CFX96 Manager

**Figura 51.** Diluciones VPH 18



**Nota.** **A)**  $10^{-3}$  ng/μL (Cq:18.68), **B)**  $10^{-8}$  ng/μL (Cq:20) **C)**  $10^{-7}$  ng/μL (Cq: 21.90) **D)**  $10^{-9}$  ng/μL (Cq: 21.91) **E)**  $10^{-11}$  ng/μL (Cq: 23.83). **Fuente:** CFX96 Manager

**Figura 52.** Diluciones VPH 45



**Nota.** **A)**  $10^{-3}$  ng/μL (Cq:21.47), **B)**  $10^{-5}$  ng/μL (Cq:24.75) **C)**  $10^{-7}$  ng/μL (Cq: 27.03) **D)**  $10^{-9}$  ng/μL (Cq: 27.94) **E)**  $10^{-11}$  ng/μL (Cq: 30.32). **Fuente:** CFX96 Manager

**Tabla 47.**

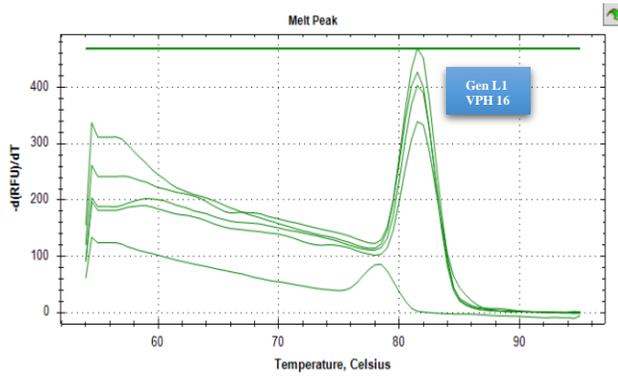
*Límite de detección del protocolo de genotipificación*

<b>Genotipo</b>	<b>Concentración Inicial (ng/<math>\mu</math>L)</b>	<b>Factor de dilución</b>	<b>Concentración Final (pg/<math>\mu</math>L)</b>
<b>VPH 16</b>	50	1.00E-7	5.00E-3
<b>VPH 58</b>	50	1.00E-7	5.00E-3
<b>VPH 45</b>	50	1.00E-11	5.00E-7
<b>VPH 18</b>	50	1.00E-11	5.00E-7
<b>VPH 31</b>	50	1.00E-6	5.00E-2

En la **Tabla 47**. Se describen los cálculos para obtener la concentración final de ADN plantilla que es capaz de reconocer el método desarrollado, ya que el procedimiento está dirigido a una prueba de genotipificación en conjunto se tomó el factor de dilución al que el primer genotipo no sea capaz de hibridar con los primers, determinando la cantidad mínima de ADN plantilla capaz de reconocer que es de 0.005pg (VPH 58) de ADN. Según **ThermoFisher Scientific, (2023)**, la cantidad de nanogramos de ADN para asegurar una correcta amplificación está entre 10 a 100ng de ADN genómico, en el protocolo desarrollado se necesitó una cantidad menor que la propuesta.

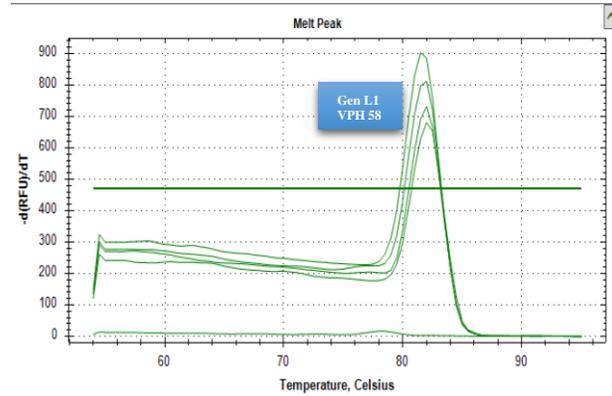
Finalmente, la integridad de los amplicones se comprobó en base a las curvas de melting, que se describen en las **Figuras 53, 54, 55, 56 y 57**. La técnica de curva de fusión o curva de melting es una técnica de biología molecular usada frecuentemente para el diagnóstico (**Heydari et al., 2019**). Consiste en analizar los productos de acuerdo con el punto de fusión de las cadenas de ADN, la temperatura de fusión es la temperatura a la cual el 50% de las cadenas dobles de ADN se vuelven monocatenarias (**Farrar & Wittwer, 2017**).

**Figura 53** *Curvas de Melting VPH 16.*



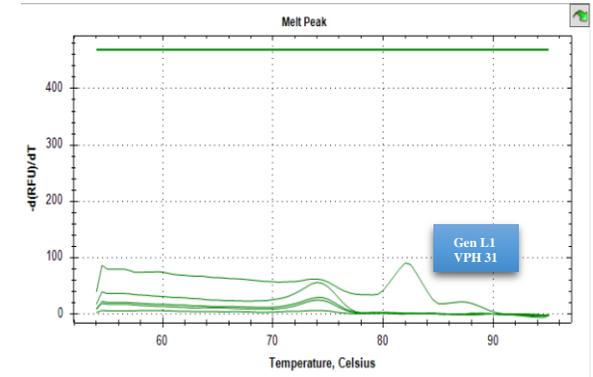
**Fuente:** CFX96 Manager

**Figura 54.** *Curvas de Melting VPH 58*



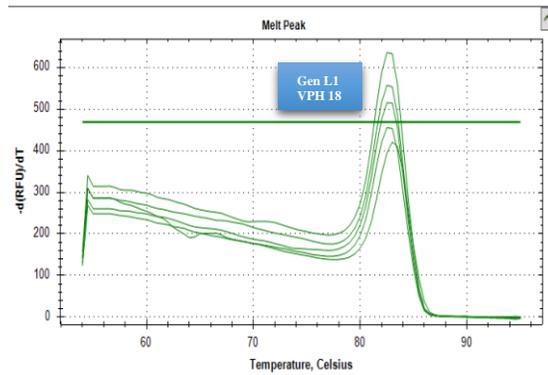
**Fuente:** CFX96 Manager

**Figura 55.** *Curvas de Melting VPH 31*



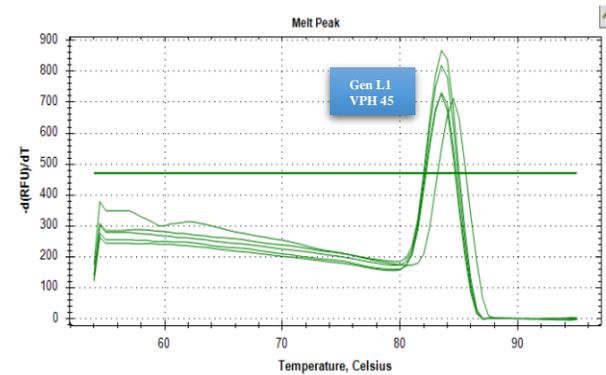
**Fuente:** CFX96 Manager

**Figura 56.** *Curvas de Melting VPH 18*



**Fuente:** CFX96 Manager

**Figura 57.** *Curvas de Melting VPH 45*



**Fuente:** CFX96 Manager

Los productos extensos de PCR poseen un patrón de fusión de transición múltiple (múltiples picos sobre el Ct) mientras que productos pequeños se presentan en fusiones de transición simple (Farrar & Wittwer, 2017). Todos los patrones de VPH poseen un solo pico de melting, es decir poseen un patrón de fusión simple, que cumple con el criterio de obtener un solo producto (Figura, 53, 54, 55, 56, 57) en este caso el fragmento de L1 de cada genotipo de VPH. En el caso de VPH 31 no existe curva de melting notoria pero si un pico mínimo que se asume es la amplificación del gen, esto se puede relacionar con la curva de amplificación del mismo genotipo en la Figura 50, se asume contaminación/degradación del control 31 en esta fase, sin embargo, el correcto funcionamiento de este par de primers para el mencionado genotipo se corrobora en el desarrollo *in silico* de la primera fase del diseño de primers mediante la verificación de especificidad en primer Blast y la PCR *in silico* (Figura 29 y 34), además el análisis de dimerización que se encuentra en el Anexo 3, el cual demuestra el cumplimiento con los parámetros de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) > -9kcal/mol y > -2kcal/mol en harpins o loops (Benchling, 2023) se recomienda la adquisición de un nuevo control para corroborar la parte experimental.

El método de curvas de melting, es confiable para la detección de productos en PCR, así lo demuestra Njage & Buys, (2020), en su ensayo de genotipificación de  $\beta$ -lactamasas en *Escherichia coli*, en donde la optimización de las condiciones para la curva de melting pueden ser utilizado en ensayos de genotipificación ya que permite la detección de un cambio de pb en los primers marcados con sonda.

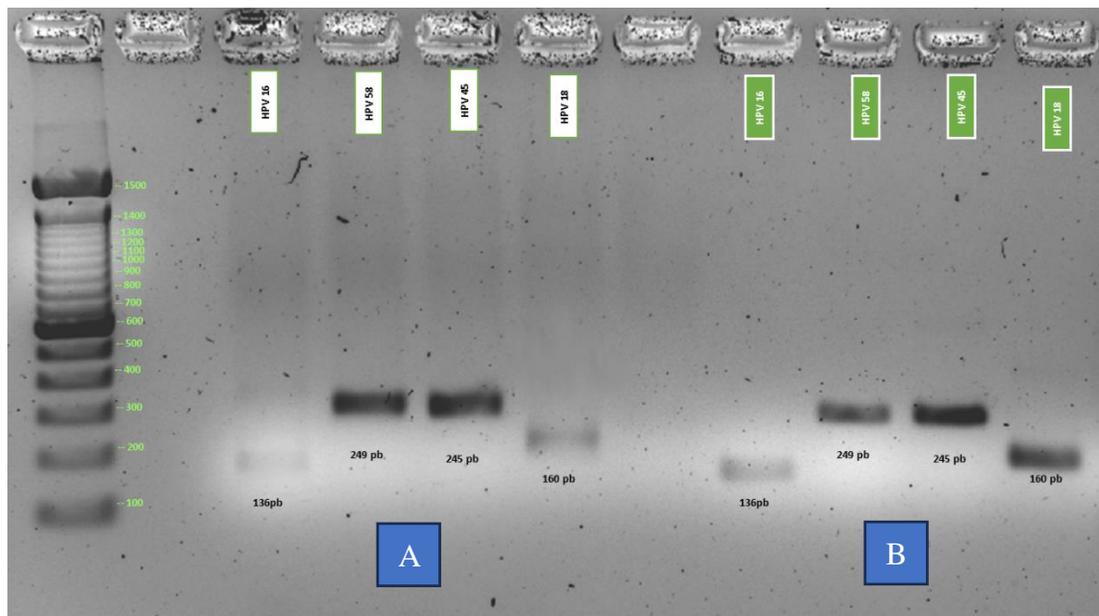
### 3.10. Integridad de Amplicones

Una vez establecido, se realizó electroforesis de los productos de PCR, para comprobar su integridad en un gel de agarosa al 2%, se usó como referencia el marcador de peso molecular TrackIt™ de Invitrogen®, no se corrió el genotipo 31 por la premura del tiempo para adquirir un nuevo control positivo

En la **Figura 58** se puede observar la amplificación del gen L1 de cada VPH con sus respectivos controles, el tamaño en pb se referenció de acuerdo con el Ladder, lo que corrobora la presencia de cada genotipo, la integridad de bandas de ADN y el funcionamiento del protocolo para los genotipos en experimentación.

**Figura 58.**

*Electroforesis de Amplicones Gen L1 VPH Genotipos 16, 58, 45, 18*



**Nota.** Gel de agarosa al 2% Zona **A**) Productos de PCR para VPH 16, 58, 45, 31 **B**) Controles para VPH 16, 58, 45 y 18. Fuente: Laboratorio de Investigación de Inmunología y Virología (ESPE)

Si bien la RT-PCR no necesita del revelado de la amplificación de productos para el diagnóstico, este es un método comprobatorio para la verificación del protocolo, como en la experimentación de **Tsakogiannis et al., (2015)** en la construcción de un método multiplex para la genotipificación de VPH donde utilizó este método para detectar fragmentos de diferente tamaño para la identificación de cada genotipo.

El ensayo anterior culmina con la primera fase de este proyecto y da paso a la optimización y resolución de problemas para la instauración de la prueba diagnóstico en próximas fases.

## CAPÍTULO IV.-

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 4.1. Conclusiones

El diseño de cebadores específicos cumple con los parámetros bioinformáticos para el desarrollo de una PCR, los criterios de especificidad y eficiencia se evaluaron mediante PCR *in silico* y BLAST, verificando el funcionamiento y la capacidad de genotipificación para las variantes 16, 18, 45, 58 y 31.

El mejor programa de termociclado para la genotipificación de las variantes de VPH 16, 18, 45, 58, 31 es una PCR de tres pasos en el ciclado. Empieza con la activación de la enzima polimerasa a 95°C por 3min, seguido de 40 ciclos de tres pasos desnaturalización a 95°C por 15s, annealing a 64°C por 15s y extensión a 60°C por 45s. posteriormente se realiza un enfriamiento a 4°C por 3min. El programa fue estandarizado en el equipo BIORAD CFX96 con la enzima BlasTaq 2X qPCR MasterMix.

Las curvas de dilución dieron una visión aproximada del límite de detección para ADN sintético, para una prueba en conjunto es necesario al menos 0.05pg de ADN sintético, así mismo el gel de electroforesis demostró la integridad de los amplicones y corroboró el funcionamiento del protocolo desarrollado para los genotipos 16,18, 45 y 58.

Finalmente, se ha diseñado un protocolo de diagnóstico molecular por RT-PCR para la genotipificación de las variantes de VPH predominantes en Ecuador (Genotipos 16, 18, 45, 58 y 31) para uso como un prototipo de genotipificación *in house* para el Laboratorio de Especialidades Médicas Ochoa & Ochoa.

## **4.2. Recomendaciones**

- Analizar la capacidad de los cebadores para poder desarrollar PCR mediante tecnología TaqMan con el fin del desarrollo de protocolos multiplex.
- Procurar adquirir enzimas de base líquida no jabonosa para los ensayos de RT-PCR, las burbujas son un factor de error en la absorbancia y al trabajar con volúmenes micrométricos, influencia en la producción de datos confiables.
- Entablar un código de bioética claro y conciso dentro de la institución para el desarrollo de una segunda fase del proyecto en donde se pueda aplicar el método en muestras humanas.
- Optimizar el protocolo para el genotipo 31 por separado y analizar los resultados.

## MATERIALES DE REFERENCIA

### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abramson, R. D. (1995). Thermostable DNA Polymerases. En *PCR Strategies* (pp. 39-57). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012372182-2/50006-X>
- Abreu, A. L. P., Souza, R. P., Gimenes, F., & Consolaro, M. E. L. (2012). A review of methods for detect human Papillomavirusinfection. *Virology Journal*, 9(1), 262. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-262>
- Altshuler, M. (2006). *PCR Troubleshooting The Essential Guide* (Caister Academic Press, Ed.). <http://www.caister.com/pcr2>
- Alvarez, M. L., & Doné, S. C. (2014). *SYBR® Green and TaqMan® Quantitative PCR Arrays: Expression Profile of Genes Relevant to a Pathway or a Disease State* (pp. 321-359). [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1062-5\\_27](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1062-5_27)
- Applied Biosystems. (2022). *Real-Time PCR Handbook 2.0*. [https://rise.articulate.com/share/CzJ69zEmF4MgocDs26iDJscAyM-xxAt-#/lessons/etcfjHVmsOoRuAYZ8Tm9ygluZ\\_q8L44W](https://rise.articulate.com/share/CzJ69zEmF4MgocDs26iDJscAyM-xxAt-#/lessons/etcfjHVmsOoRuAYZ8Tm9ygluZ_q8L44W)
- Aragones, A., Genoff, M., Gonzalez, C., Shuk, E., & Gany, F. (2016). HPV Vaccine and Latino Immigrant Parents: If They Offer It, We Will Get It. *Journal of immigrant and minority health*, 18(5), 1060-1065. <https://doi.org/10.1007/s10903-015-0225-x>
- Atta ur Rahman. (2016). *Frontiers in Clinical Drug Research* (Vol. 1). [https://www.google.com.ec/books/edition/Frontiers\\_in\\_Clinical\\_Drug\\_Research\\_HIV/7AVHDgAAQBAJ?hl=es&gbpv=0](https://www.google.com.ec/books/edition/Frontiers_in_Clinical_Drug_Research_HIV/7AVHDgAAQBAJ?hl=es&gbpv=0)
- Bedoya, C. (2019). *Virus del Papiloma Humano – VPH en mujeres – VPH en Ecuador. – Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública-INSPI- Dr. Leopoldo Izquieta Pérez*. INSPI. <http://www.investigacionsalud.gob.ec/virus-del-papiloma-humano-vph-en-mujeres-vph-en-ecuador/>
- Benchling. (2023). *Primer design for PCR*. <https://www.benchling.com/primer-design-for-pcr>
- BIORAD. (2023a). *PCR Troubleshooting*. <https://www.bio-rad.com/es-ec/applications-technologies/pcr-troubleshooting?ID=LUSO3HC4S>

- BIORAD. (2023b). *¿Qué es la PCR en tiempo real (qPCR)?* <https://www.bio-rad.com/es-ec/applications-technologies/what-real-time-pcr-qpcr?ID=LUSO4W8UU>
- Brancaccio, R. N., Robitaille, A., Dutta, S., Rollison, D. E., Tommasino, M., & Gheit, T. (2019). Isolation of a Novel Beta-2 Human Papillomavirus from Skin. *Microbiology Resource Announcements*, 8(9). <https://doi.org/10.1128/mra.01628-18>
- Brendle, S. A., Bywaters, S. M., & Christensen, N. D. (2014). *Pathogenesis of Infection by Human Papillomavirus* (pp. 47-57). <https://doi.org/10.1159/000355963>
- Burd, E. M. (2003). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 1-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.1.1-17.2003>
- Burk, R. D., Chen, Z., & Van Doorslaer, K. (2009). Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics*, 12(5-6), 281. <https://doi.org/10.1159/000214919>
- Burley, M., Roberts, S., & Parish, J. L. (2020). Epigenetic regulation of human papillomavirus transcription in the productive virus life cycle. *Seminars in Immunopathology*, 42(2), 159-171. <https://doi.org/10.1007/s00281-019-00773-0>
- Bzhalava, D., Eklund, C., & Dillner, J. (2015). International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 476, 341-344. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.028>
- Cabrera V., J. A., Cárdena H., O. J., Campoverde C., M. A., & Ortíz S., J. I. (2015). Prevalencia de genotipos del papiloma virus humano en mujeres de la provincia del Azuay, Ecuador. *MASKANA*, 6(1), 79-93. <https://doi.org/10.18537/mskn.06.01.07>
- Caguana, J. P., & Carreño, C. S. (2017). *Diagnóstico de enfermedades de transmisión sexual mediante PCR tiempo real en mujeres indígenas del Ecuador 2016* [Universidad de Cuenca ]. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/27407>
- Caister Academic Press. (2023). *Annealing Time and Temperature*. <https://www.caister.com/highveld/pcr/annealing-time-and-temperature.html#:~:text=An%20annealing%20time%20of%2030,outcome%20of%20the%20PCR%20reactions.>
- Campoverde, A., Arcentales, M., & Caguana, J. (2016). CARACTERIZACIÓN DE LOS GENOTIPOS FRECUENTES DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN MUJERES ATENDIDAS EN LOS HOSPITALES MONTE SINAI Y DEL

- SEGURO SOCIAL CUENCA- ECUADOR. 2008- 2014. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad de Cuenca* , 35(1).
- Carrión, J., Soto, Y., & Pupo, M. (2020). Infección por virus del papiloma humano en mujeres del Cantón Cañar, Ecuador. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 72(1), e500. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0375-07602020000100006](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602020000100006)
- Centers for Disease Control and Prevention. (2022, octubre 3). *How many cancers are linked with HPV each year?* How many cancers are linked with HPV each year?
- Chen, Z., Jing, Y., Wen, Q., Ding, X., Zhang, S., Wang, T., Zhang, Y., & Zhang, J. (2016). L1 and L2 gene polymorphisms in HPV-58 and HPV-33: implications for vaccine design and diagnosis. *Virology Journal*, 13(1), 167. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0629-9>
- Chuang, L. Y., Cheng, Y. H., & Yang, C. H. (2013). Specific primer design for the polymerase chain reaction. En *Biotechnology Letters* (Vol. 35, Número 10, pp. 1541-1549). <https://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Clifford, G. M., Gallus, S., Herrero, R., Muñoz, N., Snijders, P. J. F., Vaccarella, S., Anh, P. T. H., Ferreccio, C., Hieu, N. T., Matos, E., Molano, M., Rajkumar, R., Ronco, G., De Sanjosé, S., Shin, H. R., Sukvirach, S., Thomas, J. O., Tunsakul, S., Meijer, C. J. L. M., & Franceschi, S. (2005). Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *The Lancet*, 366(9490), 991-998. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67069-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67069-9)
- Dalgo Aguilar, P., Loján González, C., Córdova Rodríguez, A., Acurio Páez, K., Arévalo, A. P., & Bobokova, J. (2017). Prevalence of High-Risk Genotypes of Human Papillomavirus: Women Diagnosed with Premalignant and Malignant Pap Smear Tests in Southern Ecuador. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2017, 1-7. <https://doi.org/10.1155/2017/8572065>
- de Sanjosé, S., Brotons, M., & Pavón, M. A. (2018). The natural history of human papillomavirus infection. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 47, 2-13. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2017.08.015>

- de Sanjosé, S., Diaz, M., Castellsagué, X., Clifford, G., Bruni, L., Muñoz, N., & Bosch, F. X. (2007). Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. En *Lancet Infectious Diseases* (Vol. 7, Número 7, pp. 453-459). [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70158-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70158-5)
- Department of Health and Aged Care. (2018, noviembre). *What is an in-house IVD?* Australian Government. <https://www.tga.gov.au/resources/publication/publications/regulatory-requirements-house-ivds/what-house-ivd#:~:text=’In%2Dhouse’%20IVDs%20are,making%20decisions%20concerning%20clinical%20management.>
- Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J., & Dveksler, G. S. (1993). General concepts for PCR primer design. *Genome Research*, 3(3). <https://doi.org/10.1101/gr.3.3.S30>
- Dnasoftware. (2015, julio 21). *Myth 4: “Primer Dimer” Artifacts Are Due to Dimerization of Primers.* <https://www.dnasoftware.com/resources/news/primer-dimer-artifacts-are-due-to-dimerization-myth/#:~:text=Primer%20dimer%20artifacts%20typically%20occur,heterologous%20genomic%20DNA%20is%20added.>
- Egawa, N., & Doorbar, J. (2017). The low-risk papillomaviruses. *Virus Research*, 231, 119-127. <https://doi.org/10.1016/J.VIRUSRES.2016.12.017>
- Falcón-Córdova, D., & Carrero, Y. (2021). Situación actual de la infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) asociado a lesiones cervicales en mujeres del Ecuador. *Revision sistemática. Kasmera*, 49(1), e49133050-e49133050. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.4587242>
- Farrar, J. S., & Wittwer, C. T. (2017). High-Resolution Melting Curve Analysis for Molecular Diagnostics. En *Molecular Diagnostics* (pp. 79-102). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802971-8.00006-7>
- García Muentes, G. D., García Rodríguez, L. K., Burgos Galarraga, R. I., Almeida Carpio, F., & Ruiz Cabezas, J. C. (2016). Genotypes distribution of human papillomavirus in cervical samples of Ecuadorian women. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 19(1), 160-166. <https://doi.org/10.1590/1980-5497201600010014>

- García Regalado, J., Quinde Rosales, V., Bucaram Leverone, R., & Sánchez Giler, S. (2021). SITUACIÓN EPIDEMIOLÓGICA DEL CÁNCER CÉRVICOUTERINO EN EL ECUADOR. 2020. *Revista Venezolana de Oncología*, 33, 13. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375665418004>
- Gorgos, L. M., Sycuro, L. K., Srinivasan, S., Fiedler, T. L., Morgan, M. T., Balkus, J. E., McClelland, S. R., Fredricks, D. N., & Marrazzo, J. M. (2015). Relationship of Specific Bacteria in the Cervical and Vaginal Microbiotas With Cervicitis. *Sexually Transmitted Diseases*, 42(9), 475-481. <https://doi.org/10.1097/OLQ.0000000000000318>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2018). Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(10), pdb.top095000. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095000>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(6), pdb.top095109. <https://doi.org/10.1101/pdb.top095109>
- Haręza, D. A., Wilczyński, J. R., & Paradowska, E. (2022). Human Papillomaviruses as Infectious Agents in Gynecological Cancers. Oncogenic Properties of Viral Proteins. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3), 1818. <https://doi.org/10.3390/ijms23031818>
- Heydari, N., Alikhani, M. Y., Tahmasebi, H., Asghari, B., & Arabestani, M. R. (2019). Design of Melting Curve Analysis (MCA) by Real-Time Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Distinction of Staphylococci and Antibiotic Resistance. *Archives of Clinical Infectious Diseases, In Press(In Press)*. <https://doi.org/10.5812/archcid.81604>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2021). *El virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer - Instituto Nacional del Cáncer*. 2016. <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infecciosos/vph-y-cancer>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2022, septiembre 12). *El virus del papiloma humano (vph) y el cáncer* . <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo/germenes-infecciosos/vph-y-cancer>

- Kadri, K. (2020). Polymerase Chain Reaction (PCR): Principle and Applications. En *Synthetic Biology - New Interdisciplinary Science*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.86491>
- Karolinska Institute. (2022, agosto 24). *HPV Reference Clones* .
- Life Technologies Corporation. (2012). *Real-Time PCR handbook* . <https://www.gene-quantification.de/real-time-pcr-handbook-life-technologies-update-flr.pdf>
- Lo, M., Rossa, C. W. K., Allen, C. K. C. W. K., & Allen, C. K. C. (2006). *Clinical Applications of PCR* (Vol. 336). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/159745074X>
- Longworth, M. S., & Laimins, L. A. (2004). Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 362-372. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004>
- Mac, M., & Moody, C. A. (2020). Epigenetic Regulation of the Human Papillomavirus Life Cycle. *Pathogens*, 9(6), 483. <https://doi.org/10.3390/pathogens9060483>
- Marfatia, Y., Dixit, R., & Bhavsar, C. (2011). Laboratory diagnosis of human papillomavirus virus infection in female genital tract. *Indian Journal of Sexually Transmitted Diseases and AIDS*, 32(1), 50. <https://doi.org/10.4103/0253-7184.81257>
- Mejía, L., Muñoz, D., Trueba, G., Tinoco, L., & Zapata, S. (2016). Prevalence of human papillomavirus types in cervical cancerous and precancerous lesions of Ecuadorian women. *Journal of Medical Virology*, 88(1), 144-152. <https://doi.org/10.1002/jmv.24310>
- Moeinzadeh, M., Kheirkhah, B., Amini, K., & Pouryasian, A. (2020). Classification and identification of human papillomavirus based on its prevalence and development of cervical lesion among Iranian women. *BioImpacts*, 10(4), 235-242. <https://doi.org/10.34172/bi.2020.30>
- Moya-Salazar, J. J., & Rojas-Zumaran, V. A. (2017). Tendencias en la investigación del virus de papiloma humano en Latinoamérica frente a los países de altos ingresos. *Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología*, 68(3), 202-217. <https://doi.org/10.18597/RCOG.2679>
- Münger, K., Baldwin, A., Edwards, K. M., Hayakawa, H., Nguyen, C. L., Owens, M., Grace, M., & Huh, K. (2004). Mechanisms of human papillomavirus-induced

- oncogenesis. *Journal of virology*, 78(21), 11451-11460.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.78.21.11451-11460.2004>
- Nakagawa, M., Spencer, H. J., Coleman, H. N., Associate, R., Greenfield, W. W., & Professor, A. (2013). Distribution of Human Papillomavirus (HPV) Types and Anti-HPV T-Cell Immune Responses Among Different Racial/Ethnic Groups in Central Arkansas. *Ark Med Soc*, 109(8), 160-163.
- National Cancer Institute. (2022). *Low-Risk HPV*. NCI Dictionary of Cancer Terms.  
<https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/low-risk-hpv>
- Nguyen, K., Guo, X., & Pan, Y. (2016). Multiple Biological Sequence Alignment: Scoring Functions, Algorithms and Applications. En *Multiple Biological Sequence Alignment: Scoring Functions, Algorithms and Applications*.  
<https://doi.org/10.1002/9781119273769>
- Njage, P. M. K., & Buys, E. (2020). A High Resolution DNA Melting Curve Analysis for the Rapid and Efficient Molecular Diagnostics of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase Determinants from Foodborne Escherichia coli. *Microorganisms*, 8(1), 90.  
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8010090>
- Núñez-Troconis, J. (2022). Epidemiología del virus del papiloma humano. *Investigación Clínica*, 63(2), 170-184. <https://doi.org/10.54817/IC.v63n2a07>
- Obradovic, J., Jurisic, V., Tomic, N., Mrdjanovic, J., Perin, B., Pavlovic, S., & Djordjevic, N. (2013). Optimization of PCR Conditions for Amplification of GC-Rich *EGFR* Promoter Sequence. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 27(6), 487-493.  
<https://doi.org/10.1002/jcla.21632>
- Ochoa-Carrillo, F. J. (2014). Virus del papiloma humano. Desde su descubrimiento hasta el desarrollo de una vacuna. Parte I/III | Gaceta Mexicana de Oncología. *elsevier*, 13(5), 308-315. <https://www.elsevier.es/es-revista-gaceta-mexicana-oncologia-305-articulo-virus-del-papiloma-humano-desde-X1665920114805966>
- OMS. (2021a, noviembre 22). *Infecciones de transmisión sexual*.  
[https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis))
- OMS. (2021b, noviembre 22). *Infecciones de transmisión sexual*.

- OMS. (2023). *Infecciones de transmisión sexual*. [https://www.who.int/es/health-topics/sexually-transmitted-infections#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/sexually-transmitted-infections#tab=tab_1)
- OPS. (2020). *Vacuna contra el Virus del Papiloma Humano (VPH) | OPS/OMS | Organización Panamericana de la Salud*. <https://www.paho.org/es/tag/vacuna-contra-virus-papiloma-humano-vph>
- Organización Panamericana de la Salud. (2019, febrero 1). *El cáncer cervicouterino es el tercero más frecuente entre las mujeres de América Latina y Caribe, pero se puede prevenir*.  
[https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=14947:cervical-cancer-is-the-third-most-common-cancer-among-women-in-latin-america-and-the-caribbean-but-it-can-be-prevented&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0](https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14947:cervical-cancer-is-the-third-most-common-cancer-among-women-in-latin-america-and-the-caribbean-but-it-can-be-prevented&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0)
- Oswald, N., & Kennedy, S. (2011). *PCR Troubleshooting and Optimization: The Essential Guide* (Caister Academic Press, Ed.).  
<https://www.caister.com/highveld/pcr/primer-concentration.html>
- Prado, J., Hernández, I., Uvalcaba, J., & Ceruelos, M. del C. (2021). VPH: Generalidades, prevención y vacunación. *Journal of Negative and No Positive Results*, 6, 283-292.  
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7802869>
- Rivera, A., De la Plata, J., Montiel, M., & ROmero, C. (2018). Several works on Human Papilloma Virus in Ecuador. *Marzo*, 2(1), 1-22.  
<https://doi.org/10.31790/inspilip.v2i1.39.g44>
- Sarikaya, S., Russo, G., & Ralph, D. (2022). *Andrology and Sexual Medicine* (S. Sarikaya, G. I. Russo, & D. Ralph, Eds.). Springer International Publishing.  
<https://doi.org/10.1007/978-3-031-12049-7>
- Serretiello, E., Corrado, F., Santella, B., Chianese, A., Iervolino, D., Coppola, A., Grimaldi, E., Galdiero, M., & Franci, G. (2023). Prevalence and Distribution of High- and Low- Risk HPV Genotypes in Women Living in the Metropolitan Area of Naples: A Recent Update. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 24(2), 435-441. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2023.24.2.435>
- Silalahi, D., Wirawan, I. G. P., & Sasadara, M. M. V. (2021). Optimization of annealing temperature for amplification of *EhoscNola* locus in *pranajiwa* (*Euchresta horsfieldii*) plant collected from mountains, urban and coastal areas in Bali. *IOP*

- Conference Series: Earth and Environmental Science*, 913(1), 012059.  
<https://doi.org/10.1088/1755-1315/913/1/012059>
- Silva, G., Altamirano, F., Montenegro, W., & Silva, R. (2015). Prevalence and Molecular Epidemiology of Human Papillomavirus in Ecuadorian Women with Cervical Cytological Abnormalities. *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics*, 06(02). <https://doi.org/10.4172/2153-0602.1000174>
- Sugiarti, S. A., Nurhayati, N., & Abinawanto. (2021). Optimization of annealing temperature for detection of lipase gene in *Bacillus subtilis* using polymerase chain reaction (PCR) method. *Journal of Physics: Conference Series*, 1725(1), 012046. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/1725/1/012046>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad*, 2(2), 70-78. <https://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
- Tang, S., Liao, Y., Hu, Y., Shen, H., Wan, Y., & Wu, Y. (2021). HPV Prevalence and Genotype Distribution Among Women From Hengyang District of Hunan Province, China. *Frontiers in Public Health*, 9. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.710209>
- ThermoFisher scientific. (2023). *How to Simplify PCR Optimization Steps for Primer Annealing*. <https://www.thermofisher.com/ec/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/spotlight-articles/pcr-annealing-optimization-universal-annealing.html>
- Tsakogiannis, D., Diamantidou, V., Toska, E., Kyriakopoulou, Z., Dimitriou, T. G., Ruether, I. G. A., Gortsilas, P., & Markoulatos, P. (2015). Multiplex PCR assay for the rapid identification of human papillomavirus genotypes 16, 18, 45, 35, 66, 33, 51, 58, and 31 in clinical samples. *Archives of Virology*, 160(1), 207-214. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2261-6>
- Williams, J., Kostiuk, M., & Biron, V. L. (2022). Molecular Detection Methods in HPV-Related Cancers. *Frontiers in Oncology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.864820>

- World Health Organization. (2022, febrero 22). *Cervical cancer* .  
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cervical-cancer#:~:text=Worldwide%2C%20cervical%20cancer%20is%20the,%2D%20and%20middle%2Dincome%20countries.>
- World Health Organization. (2023). *Cervical cancer* . [https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cervical-cancer#tab=tab_1)
- Yadav, M. K., & Singh, B. P. (2017). *Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Based Identification and Detection of Fungi Belongs to Genus Fusarium* (pp. 65-85).  
[https://doi.org/10.1007/978-3-319-34106-4\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-319-34106-4_4)
- Yang, Z., Yi, W., Tao, J., Liu, X., Zhang, M. Q., Chen, G., & Dai, Q. (2022). HPVMD-C: a disease-based mutation database of human papillomavirus in China. *Database*, 2022. <https://doi.org/10.1093/database/baac018>
- Yuxi, J. R., & Gallegos, S. H. (2021). Prevalencia de serotipos del virus de papiloma humano en mujeres de Ecuador. *Revista Vive*, 4(11), 262-287.  
<https://doi.org/10.33996/revistavive.v4i11.93>
- Zhi, H.-F., Yang, L.-F., Ge, J., & Yang, X.-T. (2022). The Human Papillomavirus Infection Characteristics for Patients with Cervical Intraepithelial Neoplasia in Yunnan, China: A Sampling Survey Analysis. *Infection and Drug Resistance*, Volume 15, 2843-2851. <https://doi.org/10.2147/IDR.S364763>

## ANEXOS

### Anexo 1.

#### Análisis de dímeros Primer F/R HPV 16

Cross Dímeros	Self dímeros																				
<p><b>Total Found = 3</b></p> <p><b>1. <math>\Delta G = -8.96</math> kcal/mol (3' Cross Dimer)</b></p> <pre> 5' CTATAGGGGAACTGGGGC 3'             3' TGACCGAAACCAAGATACCT 5'                     </pre> <p><b>2. <math>\Delta G = -7.21</math> kcal/mol (3' Cross Dimer)</b></p> <pre> 5' CTATAGGGGAACTGGGGC 3'           3' TGACCGAAACCAAGATACCT 5'                     </pre> <p><b>3. <math>\Delta G = -4.03</math> kcal/mol</b></p> <pre> 5' CTATAGGGGAACTGGGGC 3'           3' TGACCGAAACCAAGATACCT 5'                     </pre>	<p><b>Total Found = 1</b></p> <p><b>1. <math>\Delta G = -6.59</math> kcal/mol</b></p> <pre> 5' CTATAGGGGAACTGGGGC 3'             3' CCGGGTCACAAGGGGATATC 5'                     </pre>																				
Runs F	Runs R																				
<p>Runs:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>#</th> <th>Start base</th> <th># of bases</th> <th>Sequence</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>12</td> <td>3</td> <td>AAA</td> </tr> </tbody> </table>	#	Start base	# of bases	Sequence	1.	12	3	AAA	<p>Runs:</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <thead> <tr> <th>#</th> <th>Start base</th> <th># of bases</th> <th>Sequence</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>6</td> <td>4</td> <td>GGGG</td> </tr> <tr> <td>2.</td> <td>16</td> <td>4</td> <td>GGGG</td> </tr> </tbody> </table>	#	Start base	# of bases	Sequence	1.	6	4	GGGG	2.	16	4	GGGG
#	Start base	# of bases	Sequence																		
1.	12	3	AAA																		
#	Start base	# of bases	Sequence																		
1.	6	4	GGGG																		
2.	16	4	GGGG																		

### Anexo 2.

#### Análisis de dímeros Primer F/R HPV 18

Cross Dímeros	Self dímeros F
<p><b>Total Found = 3</b></p> <p><b>1. <math>\Delta G = -7.48</math> kcal/mol</b></p> <pre> 5' TACTATGGGTGACACTGTGCC 3'             3' CCAATGTATTCGGTGTCCCA 5'                     </pre> <p><b>2. <math>\Delta G = -5.41</math> kcal/mol (3' Cross Dimer)</b></p> <pre> 5' TACTATGGGTGACACTGTGCC 3'                  3' CCAATGTATTCGGTGTCCCA 5'                     </pre> <p><b>3. <math>\Delta G = -3.3</math> kcal/mol (3' Cross Dimer)</b></p> <pre> 5' TACTATGGGTGACACTGTGCC 3'              3' CCAATGTATTCGGTGTCCCA 5'                     </pre>	<p><b>Total Found = 2</b></p> <p><b>1. <math>\Delta G = -4.3</math> kcal/mol (3' Dimer)</b></p> <pre> 5' TACTATGGGTGACACTGTGCC 3'                 3' CCGTGTACAGTGGGTATCAT 5'                     </pre> <p><b>2. <math>\Delta G = -4.3</math> kcal/mol (3' Dimer)</b></p> <pre> 5' TACTATGGGTGACACTGTGCC 3'                 3' CCGTGTACAGTGGGTATCAT 5'                     </pre> <p><b>Self dímero R</b></p> <p><b>Total Found = 1</b></p> <p><b>1. <math>\Delta G = -3.91</math> kcal/mol (3' Dimer)</b></p> <pre> 5' ACCCTGTGCCTTATGTAACC 3'               3' CCAATGTATTCGGTGTCCCA 5'                     </pre>
Runs F	Runs R

Runs:			
#	Start base	# of bases	Sequence
1.	7	3	GGG

Runs:			
#	Start base	# of bases	Sequence
1.	6	4	GGGG
2.	16	4	GGGG

### Anexo 3.

#### Análisis de dímeros Primer F/R HPV 31

Cross Dímeros	Self dímeros F												
<p><b>Total Found = 1</b></p> <p>1. <math>\Delta G = -4.55</math> kcal/mol (3' Cross Dimer)</p> <pre> 5' ATTGACCACACCTCCCTCAG 3'             3' GTCGTCCTATATCCCGTG 5' </pre>	<p><b>Total Found = 1</b></p> <p>1. <math>\Delta G = -4.53</math> kcal/mol (3' Dimer)</p> <pre> 5' ATTGACCACACCTCCCTCAG 3'                 3' GACTCCCTCCACACCAGTTA 5' </pre>												
<p><b>Harpin F</b></p> <p><b>Total Found = 1</b></p> <p>1. <math>\Delta G = -0.03</math> kcal/mol (3' Hairpin)</p> <pre> rACACCAGTTA 5' C       cTCCCTCAG 3' </pre>	<p><b>Self dímero R</b></p> <p><b>Total Found = 2</b></p> <p>1. <math>\Delta G = -3.91</math> kcal/mol</p> <pre> 5' GTGCCCTATATCCTGCCTG 3'                 3' GTCGTCCTATATCCCGTG 5' </pre> <p>2. <math>\Delta G = -3.4</math> kcal/mol</p> <pre> 5' GTGCCCTATATCCTGCCTG 3'                 3' GTCGTCCTATATCCCGTG 5' </pre>												
<p><b>Runs F</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Runs:</th> </tr> <tr> <th>#</th> <th>Start base</th> <th># of bases</th> <th>Sequence</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>14</td> <td>3</td> <td>CCC</td> </tr> </tbody> </table>	Runs:				#	Start base	# of bases	Sequence	1.	14	3	CCC	
Runs:													
#	Start base	# of bases	Sequence										
1.	14	3	CCC										

### Anexo 4.

#### Análisis de dímeros Primer F/R HPV 45

Cross Dímeros	Self dímeros F
<p><b>Total Found = 2</b></p> <p>1. <math>\Delta G = -5.84</math> kcal/mol</p> <pre> 5' TTGGTTGGGCATGTGTAGG 3'                 3' GTGTGAAACATTTGGACGTGT 5' </pre> <p>2. <math>\Delta G = -4.26</math> kcal/mol</p> <pre> 5' TTGGTTGGGCATGTGTAGG 3'                 3' GTGTGAAACATTTGGACGTGT 5' </pre>	<p><b>Total Found = 1</b></p> <p>1. <math>\Delta G = -5.38</math> kcal/mol</p> <pre> 5' TTGGTTGGGCATGTGTAGG 3'                 3' GGATGTGTACGGGTTTGGTT 5' </pre>
	<p><b>Self dímero R</b></p>

	<p><b>Total Found = 2</b></p> <p><b>1. <math>\Delta G = -7.05</math> kcal/mol</b></p> <pre> 5' TGTGCAGGTTTACAAAGTGTG 3'            3' GTGTGAAACATTGGACGTGT 5' </pre> <p><b>2. <math>\Delta G = -4.3</math> kcal/mol (3' Dimer)</b></p> <pre> 5' TGTGCAGGTTTACAAAGTGTG 3'                3' GTGTGAAACATTGGACGTGT 5' </pre>																																
<p><b>Runs F</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Runs:</th> </tr> <tr> <th>#</th> <th>Start base</th> <th># of bases</th> <th>Sequence</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>5</td> <td>3</td> <td>TTT</td> </tr> <tr> <td>2.</td> <td>8</td> <td>3</td> <td>GGG</td> </tr> </tbody> </table>	Runs:				#	Start base	# of bases	Sequence	1.	5	3	TTT	2.	8	3	GGG	<p><b>Runs R</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Runs:</th> </tr> <tr> <th>#</th> <th>Start base</th> <th># of bases</th> <th>Sequence</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>9</td> <td>3</td> <td>TTT</td> </tr> <tr> <td>2.</td> <td>14</td> <td>3</td> <td>AAA</td> </tr> </tbody> </table>	Runs:				#	Start base	# of bases	Sequence	1.	9	3	TTT	2.	14	3	AAA
Runs:																																	
#	Start base	# of bases	Sequence																														
1.	5	3	TTT																														
2.	8	3	GGG																														
Runs:																																	
#	Start base	# of bases	Sequence																														
1.	9	3	TTT																														
2.	14	3	AAA																														

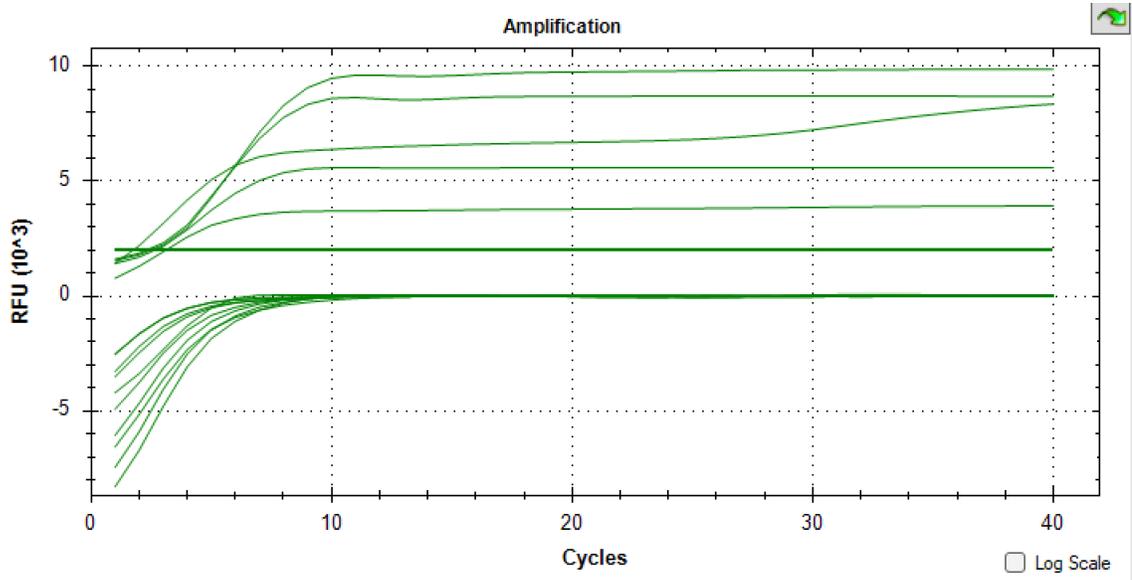
## Anexo 5.

### Análisis de dímeros Primer F/R HPV 58

<p><b>Cross Dímeros</b></p> <p><b>Total Found = 2</b></p> <p><b>1. <math>\Delta G = -8.04</math> kcal/mol (3' Cross Dimer)</b></p> <pre> 5' GGAGGACTGGCAATTTGGTTT 3'            3' TCGTTTCGGGTCTGATTTTGC 5' </pre> <p><b>2. <math>\Delta G = -4.52</math> kcal/mol</b></p> <pre> 5' GGAGGACTGGCAATTTGGTTT 3'              3' TCGTTTCGGGTCTGATTTTGC 5' </pre>	<p><b>Self dímeros F</b></p> <p><b>Total Found = 1</b></p> <p><b>1. <math>\Delta G = -5.36</math> kcal/mol</b></p> <pre> 5' GGAGGACTGGCAATTTGGTTT 3'                                3' TTTGGTTTAACGGTCAGGAGG 5' </pre>																																				
<p><b>Runs F</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Runs:</th> </tr> <tr> <th>#</th> <th>Start base</th> <th># of bases</th> <th>Sequence</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>14</td> <td>3</td> <td>TTT</td> </tr> <tr> <td>2.</td> <td>19</td> <td>3</td> <td>TTT</td> </tr> </tbody> </table>	Runs:				#	Start base	# of bases	Sequence	1.	14	3	TTT	2.	19	3	TTT	<p><b>Runs R</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="4">Runs:</th> </tr> <tr> <th>#</th> <th>Start base</th> <th># of bases</th> <th>Sequence</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1.</td> <td>3</td> <td>4</td> <td>TTTT</td> </tr> <tr> <td>2.</td> <td>12</td> <td>3</td> <td>GGG</td> </tr> <tr> <td>3.</td> <td>16</td> <td>3</td> <td>TTT</td> </tr> </tbody> </table>	Runs:				#	Start base	# of bases	Sequence	1.	3	4	TTTT	2.	12	3	GGG	3.	16	3	TTT
Runs:																																					
#	Start base	# of bases	Sequence																																		
1.	14	3	TTT																																		
2.	19	3	TTT																																		
Runs:																																					
#	Start base	# of bases	Sequence																																		
1.	3	4	TTTT																																		
2.	12	3	GGG																																		
3.	16	3	TTT																																		

**Anexo 6.**

*Ensayo de comprobación de reactivos*



**Fuente:** CFX96 Manager (LEM Ochoa)