

Artículo Original/ Original Article

Optimización de una técnica de PCR convencional para detección de virus de papiloma humano tipo 16 y 18

Laura Elena Bernal Aguirre¹, Pamela Esther Mongelós Dacunte², Tania Mabel Alfonso Salinas¹, Fátima Cardozo², *Laura Patricia Mendoza Torres²

Universidad Nacional de Asunción, Facultad de Ciencias Químicas. Paraguay
Universidad Nacional de Asunción, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Departamento Salud Pública. Paraguay

Cómo referenciar este artículo/
How to reference this article:

Bernal Aguirre LE, Mongelós Dacunte PE, Alfonso Salinas TM, Cardozo F, Mendoza Torres LP. Optimización de una técnica de PCR convencional para detección de virus de papiloma humano tipo 16 y 18. *Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud. 2018; 16(3): 6-12*

RESUMEN

El cáncer de cuello uterino es el segundo cáncer femenino más común a nivel mundial. El agente causal es el virus de papiloma humano (VPH). Se han identificado 13 tipos de virus de papiloma humano de alto riesgo oncogénico (VPH-AR), entre los cuales el VPH 16 y VPH 18 son los más frecuentemente detectados en cáncer de cuello uterino, siendo en Paraguay detectados en el 70% de casos de cáncer invasor. Por ello, el objetivo fue estandarizar y determinar el límite de detección de una técnica de PCR convencional para la detección de VPH 16 y 18. Para la detección de ADN de VPH 16 y 18, se observaron mejores resultados con 2mM de MgCl₂ y 60°C para la temperatura de alineamiento. El límite de detección para las PCR fue de 14,6x10⁻¹¹ng/μL para VPH 16 y 21,7x10⁻¹²ng/μL para VPH 18. Este trabajo servirá de base a otros estudios de detección e identificación de estos tipos virales por PCR, con miras a identificar un grupo de mujeres positivas para VPH-AR que poseen mayor riesgo de desarrollo de lesión y cáncer de cuello uterino y precisan de un seguimiento más cercano.

Palabras clave: Cáncer de cuello uterino, VPH 16, VPH 18, PCR.

Optimization of a conventional PCR technique for detection of human papillomavirus type 16 and 18

ABSTRACT

Cervical cancer is the second most common female cancer worldwide. It is caused by the human papilloma virus (HPV). Thirteen genotypes of high oncogenic risk human papilloma viruses (HPV-HR) have been identified, among which types 16 and 18 are the most frequently detected in cervical cancer. In Paraguay, they are detected in 70% of the invasive cancer cases. Therefore, the objective was to standardize and determine the detection limit of a conventional PCR technique for the detection of HPV 16 and 18. Better results were observed with 2mM MgCl₂ and 60°C for the alignment temperature in detection of HPV 16 and 18 DNA. The limit of detection was 14.6x10⁻¹¹ng/μL for HPV 16 and 21.7x10⁻¹²ng/μL for HPV 18. This work will help other studies for the detection and identification of these viral types by PCR in order to identify a group of HPV-HR positive women who have higher risk for the development of lesions and cervical cancer and need a closer follow-up.

Keywords: Cervical cancer, HPV 16, HPV 18, PCR.

INTRODUCCIÓN

El virus de papiloma humano (VPH) es un virus ADN de doble hebra, su genoma posee aproximadamente 8000 pares de bases y en él se diferencian tres regiones:

Fecha de recepción: octubre 2018. Fecha de aceptación: noviembre 2018

***Autor correspondiente:** Laura Mendoza. Departamento de Salud Pública, Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Asunción, Cecilio Báez, CP 930, Campus Universitario, San Lorenzo, Paraguay.

Email: lauramendozatorres@gmail.com

1. La región reguladora larga (LCR) la cual es no codificante y posee secuencias que controlan la transcripción y replicación viral, ya que posee elementos cis necesarios para la replicación y transcripción del ADN viral⁽¹⁾.
2. La región temprana E, que codifica para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7, involucradas en múltiples funciones como transcripción, replicación y transformación celular. Las oncoproteínas E6 y E7 crean inestabilidad genómica e interfieren en vías de proteínas supresoras de tumores⁽²⁾.
3. Y la región tardía L, que codifica para las proteínas estructurales L1 y L2 las cuales forman la cápside viral y participan en el ensamblaje del ADN viral. Las proteínas L1 y L2 se ensamblan en capsómeros para dar lugar a la cápside de forma icosaédrica que contiene el genoma viral^(1,3).

Actualmente se han descrito más de 150 tipos de VPH, de los cuales aproximadamente 50 infectan la mucosa genital. Los VPH de tropismo mucoso se clasifican en tipos de 'alto' (VPH-AR) y 'bajo' (VPH-BR) riesgo oncogénico, siendo los de bajo riesgo los causantes de lesiones benignas y los de alto riesgo los causantes de lesiones que pueden progresar a tumores malignos⁽⁴⁻⁷⁾.

Los genotipos incluidos en el grupo de virus de alto riesgo oncogénico son 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Esta clasificación obedece a su relación con el desarrollo de neoplasia intraepitelial cervical (CIN). Estudios previos han demostrado que los tipos 16 y 18 son los genotipos de alto riesgo más frecuentemente detectados en cáncer cervical; en aproximadamente el 50% y 20% de casos, respectivamente^(3,4,8,9).

La infección persistente puede dar lugar a una lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (LSIL) y ésta conducir a una lesión intraepitelial escamosa de alto grado (HSIL) y cáncer en un promedio de 5 a 14 años si no se detectan y se tratan. Es importante el tipo viral, ya que la persistencia viral constituye un factor de riesgo clave para el desarrollo de lesiones de alto grado y cáncer. La persistencia está genéticamente determinada y guarda relación con la patogenicidad^(3,10). Sin embargo, la progresión a cáncer ocurre solo en un pequeño porcentaje de mujeres infectadas, ya que la mayoría elimina la infección en 1-2 años⁽¹¹⁾.

A nivel mundial se registraron aproximadamente 528.000 casos nuevos de cáncer de cuello uterino y 266.000 muertes en 2012⁽¹²⁾. En Paraguay un estudio realizado en el 2012 por Kasamatsu *et al.* observó en 432 casos de cáncer cervical, una frecuencia de 64,6% de VPH 16, seguido de 8,5% por VPH 18 y 5,4% de VPH 45⁽¹³⁾.

Sin embargo, debido a que la mayoría de pruebas de VPH basadas en ADN tienen un bajo valor predictivo positivo para detección de CIN2 o más, se debe identificar a las mujeres en riesgo de desarrollar una infección persistente o lesión precursora de cáncer mediante pruebas de *triage* para evitar la sobrecarga al sistema de salud y la carga emocional que representa para la mujer⁽¹⁴⁾.

Debido a esto, se diseñó este estudio con el objetivo de estandarizar y determinar el límite de detección de una técnica de PCR convencional para la detección de VPH 16 y 18 que puede ser utilizada como *triage* con miras a su implementación en servicios de salud y para orientar el manejo clínico de mujeres positivas para VPH-AR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la optimización de las PCR se utilizaron controles positivos de VPH 16 y VPH 18 provenientes del biobanco del Departamento de Salud Pública (IICS-UNA), previamente tipificados en estudios anteriores (14INVO36, P11/2010). Fueron utilizados controles puros y diluidos.

Para la extracción de ADN viral de los controles positivos se utilizó el kit comercial AccuPrep® Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, Corea) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN extraído fue almacenado a -20°C hasta su procesamiento.

Optimización de PCR para VPH 16 y VPH 18

La detección del genoma de VPH 16 y VPH 18 se realizó amplificando un fragmento de la región LCR de controles positivos a través de reacciones de PCR descritas por Ho *et al.* en 1991 para VPH 16, y Ong *et al.* en 1993 para la detección de VPH 18. Se utilizaron los *primers* 16a/16b para VPH 16, y 18a/18b para VPH 18, que amplifican un fragmento de 364 pares de bases y 320 pares de bases, respectivamente^(15,16) (Tabla 1).

Tabla 1. Secuencias de los *primers* 16a/16b y 18a/18b utilizados para las reacciones de PCR

1	5'-GGGGTACCTCGGTTGCATGCTTTTTGGC-3'
6 ^a	(Forward)
1	5'-GGTCTAGACGGTTTGCACACACCCATGT-3' (Reverse)
6 ^b	
1	5'-GGGGATCCCGGTTGCATAAACTATGTAT-3' (Reverse)
8 ^a	
1	5'-GGAAGCTTTCGGTTGCCTTTGGCTTATG-3' (Forward)
8 ^b	

Cada tubo de reacción contenía 2 µL de buffer 10x, 1,6 µL de MgCl₂ 25 mM, 1,6 µL de dNTPs 2,5 mM, 1 µL de cada *primer* 16a/16b ó 18a/18b, 0,17 µL de Taq polimerasa 5 U/L (Thermo Scientific, EEUU), 9,63 µL de agua libre de Nucleasa (Thermo Scientific, EEUU) y 3 µL del control positivo para VPH 16 o VPH 18, para un volumen final de 20 µL. Las condiciones de termociclado fueron 40 ciclos de 3 minutos a 94 °C, luego 94 °C por 1 minuto, 65 °C por 1,5 minutos y 72 °C por 2 minutos, un paso final de 5 minutos a 72 °C.

La presencia del genoma del VPH se visualizó por electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata según el protocolo establecido por Sanguinetti *et al.*, 1994. En cada corrida electroforética se utilizó un marcador de peso molecular 50 pares de bases (Thermo Scientific, EEUU)^(17,18).

Bajo estas condiciones se probó la reacción a tres concentraciones distintas de MgCl₂: a 1,5mM; 2,0mM y 2,5mM. Para determinar la temperatura de alineamiento, se probó la reacción a 60 y 65°C.

Determinación del límite de detección

Posterior a la optimización de las PCR se determinó el límite de detección de las reacciones utilizando un control positivo de VPH 16 de 14,6ng/µL y un control positivo de VPH 18 de 21,7ng/µL. Se prepararon diluciones seriadas con factor de dilución de 10. Se seleccionaron las diluciones de 10⁻⁵ a 10⁻¹² del control VPH 16 y, de 10⁻⁶ a 10⁻¹³ del control VPH 18, a fin de determinar hasta que título es detectable el genoma viral.

Todas las diluciones de los controles fueron sometidas a PCR por triplicado y posterior electroforesis. Se obtuvieron tres geles mediante los cuales determinó el límite de detección para cada tipo de VPH, concordando al menos dos de ellos en la última dilución en la que se detectó producto.

RESULTADOS

Optimización de PCR para VPH 16 y VPH 18

En relación a la concentración de MgCl₂, para el control VPH 16 puros se observaron bandas a las tres concentraciones analizadas. Con el control diluido sólo se observaron bandas a 2 y 2,5 mM. Sin embargo, se optó por utilizar la concentración final de 2mM ya que se obtuvieron bandas nítidas tanto con el control puro como diluido.

Para el control VPH 18 puro se observaron bandas a 2 y 2,5mM, mientras que el control diluido sólo presentó banda a 2,0mM. Por lo tanto, se optó por utilizar la concentración final de 2mM. Estos resultados se aprecian en la Figura 1.

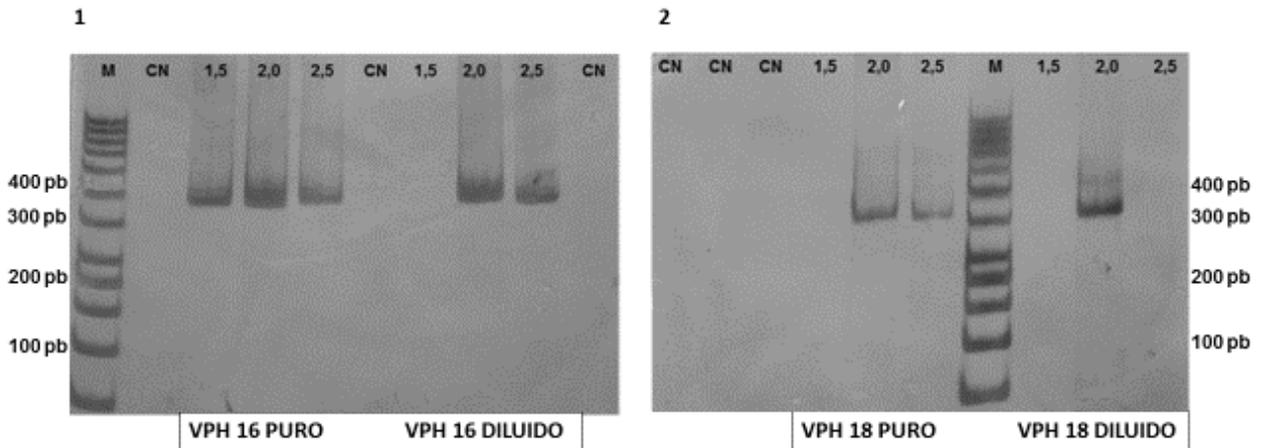


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de los productos amplificados para la región LCR de VPH 16 y 18 a distintas concentraciones de $MgCl_2$. (M) Marcador de 50 pares de bases. (CN) Control negativo. (1,5) Control a 1,5 mM de $MgCl_2$. (2,0) Control a 2,0 mM de $MgCl_2$. (2,5) Control a 2,5 mM de $MgCl_2$.

En cuanto a la temperatura de alineamiento, se probaron las reacciones a 60°C y 65°C. En la Figura 2 se observan los productos de amplificación de VPH 16 y VPH 18 a 60°C y 65°C, respectivamente. Con la primera temperatura analizada se observaron bandas nítidas tanto para el control de VPH 16 como para el control de VPH 18, mientras que a 65°C solo se visualizó una banda tenue correspondiente al control VPH 16 puro. Con base en esto se optó por la temperatura de 60°C en ambas reacciones.

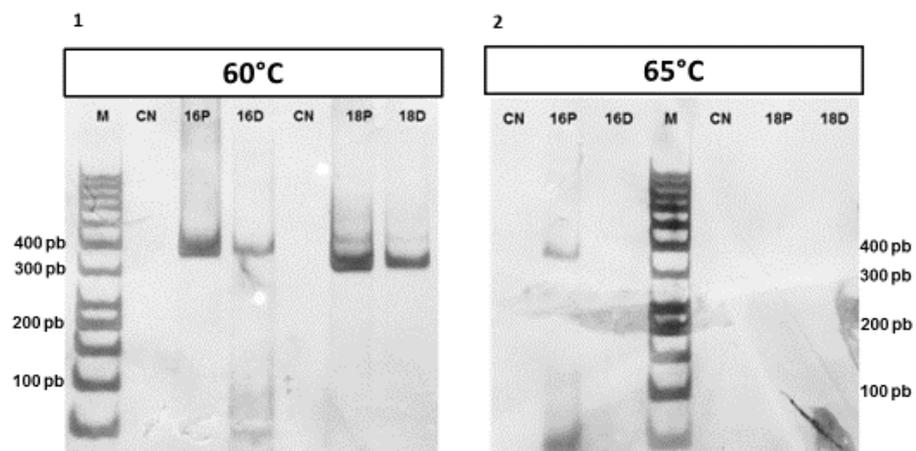


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de los productos amplificados para la región LCR de VPH 16 y 18 a 60 y 65°C. (M) Marcador de 50 pares de bases. (CN) Control negativo. (16P) Control VPH 16 puro. (16D) Control VPH 16 diluido. (18P) Control VPH 18 puro. (18D) Control VPH 18 diluido.

Límite de detección

En relación al límite de detección para VPH 16, en la Figura 3 se observa un resultado positivo hasta la dilución 10^{-11} , es decir, hasta $14,6 \times 10^{-11} \text{ ng}/\mu\text{L}$.

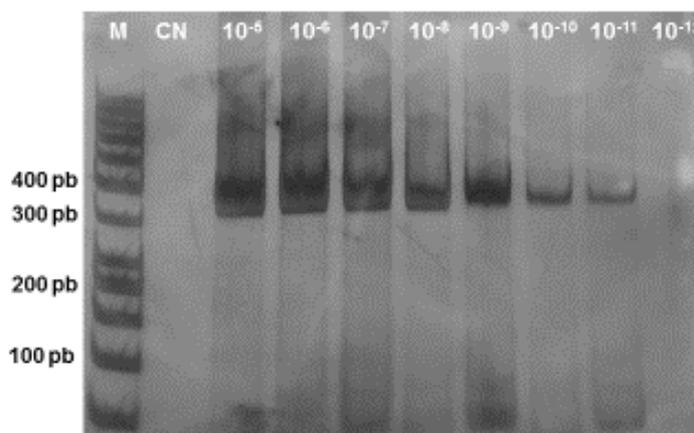


Figura 3. Límite de detección para PCR VPH 16. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de los productos amplificados para la región LCR de VPH 16. (M) Marcador de 50 pares de bases, (CN) Control Negativo. Carriles 3 al 10: diluciones del control positivo de VPH 16 desde 10^{-5} al 10^{-12} (ensayo realizado por triplicado).

Para el control VPH 18, se observó resultado positivo hasta la dilución 10^{-12} , es decir hasta $21,7 \times 10^{-12}$ ng/ μ L. Estos resultados se observan en la Figura 4.

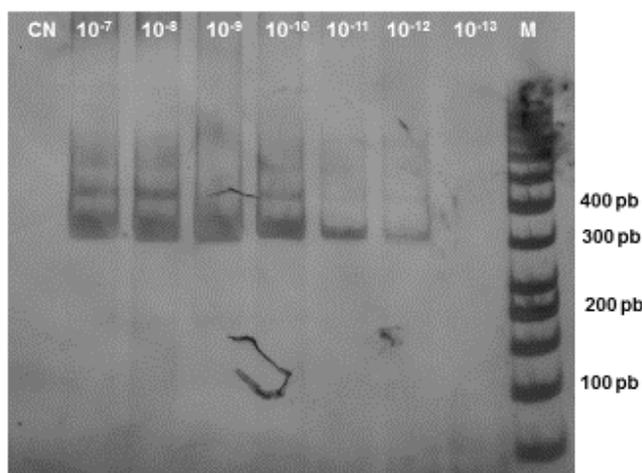


Figura 4. Límite de detección para PCR VPH 18. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% de los productos amplificados para la región LCR de VPH 18. (CN) Control Negativo. Carriles 2 al 9: diluciones del control positivo de VPH 18 desde 10^{-7} al 10^{-13} . (M) Marcador de 50 pares de bases (ensayo realizado por triplicado).

En la Tabla 2 se encuentran resumidas las condiciones de PCR optimizadas.

Tabla 2. Condiciones de PCR optimizadas

	VPH 16	VPH 18
Concentración de $MgCl_2$ (mM)	2	2
Temperatura de Alineamiento ($^{\circ}C$)	60	60
Límite de detección	10^{-11}	10^{-12}

DISCUSIÓN

Las infecciones persistentes por VPH-AR constituyen un factor de riesgo importante para el desarrollo de cáncer cervical⁽¹¹⁾. En Paraguay, se observó una alta frecuencia de casos de cáncer invasor positivos para los genotipos 16 y 18^(13,19). En este estudio se estandarizó y

se determinó el límite de detección de una técnica de PCR convencional para la detección de VPH 16 y 18.

En ambas reacciones de PCR se optó por utilizar una concentración final de $MgCl_2$ de 2 mM ya que se observaron bandas más nítidas. Esta concentración difiere de la reportada por Tornesello *et al.*, 2000⁽²⁰⁾, donde se utilizó 2,5 mM para VPH 16 mientras que Ariaspulido *et al.*, 2005⁽²¹⁾ reportan 2,5 mM en la amplificación de VPH 18.

En relación a la temperatura de alineamiento, la seleccionada fue de 60°C para ambas reacciones. Este resultado concuerda con la temperatura de alineamiento calculada en base al porcentaje de G+C y A+T de los *primers*, la cual fue de 61°C para VPH 16 y de 57°C para VPH 18⁽¹⁷⁾. Esto difiere de lo reportado por Tornesello *et al.*⁽²⁰⁾ para VPH 16, y Ariaspulido *et al.*⁽²¹⁾ para VPH 18, que reportan 55°C y 58°C respectivamente. Sin embargo Chow *et al.*, 1990 reportaron 50°C para VPH 16 y 60°C para VPH 18⁽²²⁾. Estos resultados sugieren que sería factible realizar una reacción multiplex con ambos, eventualmente.

Se observó un límite de detección de $14,6 \times 10^{-11} ng/\mu L$ para VPH 16 y de $21,7 \times 10^{-12} ng/\mu L$ para VPH 18. Estos resultados difieren de lo que reportan otros autores como Chow *et al.*, 1990⁽²²⁾ que obtuvieron un límite de detección de al menos 0,01 μg de ADN genómico de líneas celulares Si-Ha (VPH16) y C4-1 (VPH18). Lo que sugiere que las reacciones son capaces de detectar pequeñas cantidades de ADN viral. Las diferencias en estos resultados pudieron deberse a diferentes condiciones en que fue determinado el límite de detección⁽⁸⁾.

En conclusión, el presente estudio permitió optimizar una PCR convencional que permite detectar bajas concentraciones de VPH 16 y 18 y que podrá ser utilizada como una potencial prueba de *triage*, con miras a identificar mujeres VPH-AR positivas que poseen más riesgo de desarrollo de lesiones de cuello uterino y cáncer y precisan de un control más cercano.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. International Agency for Research on Cancer, editor. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, volume 90, Human papillomaviruses: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 15 - 22 February 2005. Lyon: IARC; 2007. 670 p.
2. Litwin T, Clarke M, Dean M, Wentzensen N. Somatic Host Cell Alterations in HPV Carcinogenesis. *Viruses*. 2017 Aug 3;9(12):206.
3. Burk RD, Chen Z, Van Doorslaer K. Human Papillomaviruses: Genetic Basis of Carcinogenicity. *Public Health Genomics*. 2009;12(5-6):281-90.
4. Yar DD, Salifu SP, Darko SN, Annan AA, Gyimah AA, Buabeng KO, et al. Genotypic characterisation of human papillomavirus infections among persons living with HIV infection; a case-control study in Kumasi, Ghana. *Trop Med Int Health*. 2016;21(2):275-82.
5. de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun;324(1):17-27.
6. Graham S V. Europe PMC Funders Group Human papillomavirus: gene expression, regulation and prospects for novel diagnostic methods and antiviral therapies. 2012;5(10):1493-506.
7. Pan American Health Organization. Integrating HPV Testing in Cervical Cancer Screening Programs. Washington, D.C.; 2016. 68 p.
8. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellasagué X, Shah K V, et al. Epidemiologic Classification of Human Papillomavirus Types Associated with Cervical Cancer. *N Engl J Med*. 2003;3518-27.
9. Chinchai T, Chansaenroj J, Swangvaree S, Junyangdikul P, Poovorawan Y. Prevalence of Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2012 Jul;22(6):1063-8.
10. Radley D, Saah A, Stanley M. Persistent infection with human papillomavirus 16 or 18 is strongly linked with high-grade cervical disease. *Hum Vaccin Immunother*. 2016;12(3):768-72.
11. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2017;1-12.
12. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0. Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No 11. 2012;4.
13. Kasamatsu E, Cubilla AL, Alemany L, Chaux A, Tous S, Mendoza L, et al. Type-specific human papillomavirus distribution in invasive cervical carcinomas in Paraguay. A study of 432 cases. *J Med Virol*. 2012 Oct;84(10):1628-35.
14. Ronco G, Dillner J, Elfstrom M, Tunesi S, Snijders P, Arbyn M. Efficacy of HPV-based screening for prevention of invasive cervical cancer: follow-up of four European randomised controlled trials. *Lancet*. 2013;383(13):524-32.

15. Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, et al. Sequence Variants of Human Papillomavirus Type-16 in Clinical-Samples Permit Verification and Extension of Epidemiologic Studies and Construction of a Phylogenetic Tree. *J Clin Microbiol.* 1991;29(9):1765-72.
16. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol.* 1993;67(11):6424-31.
17. Tm Calculator. Thermo Fisher Scientific [Internet]. Available from: <https://www.thermofisher.com/py/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html>
18. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques.* 1994 Nov;17(5):914-21.
19. Mendoza LP, Arbiza J, Páez M, Kasamatsu E, Castro A, Giménez G, et al. Distribution of human papillomavirus genotypes in Paraguayan women according to the severity of the cervical lesion. *J Med Virol.* 2011 Aug;83(8):1351-7.
20. Tornesello ML, Buonaguro FM, Buonaguro L, Salatiello I, Beth-Giraldo E, Giraldo G. Identification and functional analysis of sequence rearrangements in the long control region of human papillomavirus type 16 Af-1 variants isolated from Ugandan penile carcinomas. *J Gen Virol.* 2000;81(12):2969-82.
21. Arias-Pulido H, Peyton CL, Torrez-martinez, Anderson DN, Wheeler CM. Human papillomavirus type 18 variant lineages in United States populations characterized by sequence analysis of LCR-E6. 2005;338:22-34.
22. Chow VTK, Tham KM, Bernard HU. Thermus aquaticus DNA polymerase-catalysed chain reaction for the detection of human papillomaviruses. 1990;27:101-12.