

Electroforesis horizontal en geles de poliacrilamida en la detección y tipificación del virus de papiloma humano

Mg Scs. Jhon Fredy Cruz Gómez, Militza Quintero Vega, Marco Bastidas, Willian Quintero, Lic. Danmaris Hernández, Carlos Duque, Natasha Blanco, Lisbet Rojas, Reinaldo Guzmán, Marise Solorzano, Nol Salcedo, Aux.Lab. Nereyda García, Dr. Juan Puig Pons

Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX), Facultad de Ciencias, Departamento de Biología, Universidad de Los Andes. Mérida, Estado Mérida, Venezuela

RESUMEN

Objetivo: Estandarizar el uso de electroforesis horizontal en poliacrilamida como un método rápido de fácil implementación y de alta sensibilidad para la detección y tipificación del virus del papiloma humano por reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción con la enzima HpyCH4V como única enzima de restricción.

Métodos: Se utilizó el ácido desoxirribonucleico de 17 tipos de virus del papiloma humano, clonados en la colección del Laboratorio de Biología y Medicina Experimental (LABIOMEX-ULA), para la amplificación de la región flanqueada por los oligonucleótidos MY09/ MY11, los amplificados obtenidos se sometieron a digestión enzimática con la enzima HpyCH4V. El producto se corrió en geles de poliacrilamida de rápida polimerización en equipos de electroforesis horizontales. El ácido desoxirribonucleico se tiñó con bromuro de etidio y fueron fotografiados con la utilización de un trans-iluminador de luz ultravioleta.

Resultados: Se corrieron muestras de 17 tipos diferentes de virus del papiloma humano en geles de poliacrilamida en electroforesis horizontal sudmarina. Se observaron patrones de digestión, con la enzima de restricción HpyCH4V, bien definidos y distintos para 15 tipos diferentes. Se presentó una coincidencia de patrón polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción para los tipos 45 y 52 ambos de alto riesgo. Se obtuvo una excelente resolución en corridas de 2,5 cm de longitud para cualquier patrón polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción de los 17 tipos de virus del papiloma humano analizados.

Conclusión: El análisis de las corridas permitió una eficiente caracterización de los 17 tipos virales. La comparación del índice de movilidad relativa con polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción virtual de los fragmentos amplificados presentó diferencias mínimas, el análisis de la movilidad en agarosa y poliacrilamida se ajustaron perfectamente permitiendo la sustitución de la agarosa por la poliacrilamida.

Palabras clave: Virus del papiloma humano. Tipificación. Electroforesis. Reacción en cadena de la polimerasa-polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción. Gel poliacrilamida.

SUMMARY

Objective: To standardize the use of horizontal electrophoresis in polyacrylamide as a quick method of easy implementation and high sensitivity for the detection and typing of Human Papillomavirus by PCR-RFLP with HpyCH4V enzyme as unique restriction enzyme.

Methods: DNA from 17 Human Papillomavirus types, cloned in the collection of the Laboratory of Experimental Biology and Medicine, for amplification of the region flanked by the MY09/ MY11 oligonucleotides were used, the amplified obtained were subjected to enzymatic digestion with the enzyme HpyCH4V. The product was run on polyacrylamide gels rapid polymerization horizontal electrophoresis equipment. Stained with ethidium bromide and were photographed with the use of a trans-illuminating UV.

Results: Samples of 17 different Human Papillomavirus types polyacrylamide gel electrophoresis were run horizontally. Digestion patterns were observed with the restriction enzyme HpyCH4V, well-defined and different for different types 15. A pattern match for RFLP types 45 and 52 both high risk presented. Excellent resolution on runs of 2.5 cm in length for any RFLP pattern of the 17 Human Papillomavirus types analyzed was obtained.

Conclusion: The analysis of the runs allows efficient characterization of the 17 Human Papillomavirus types. Comparing the relative mobility rate with the virtual RFLP of amplified fragments present minimal differences, analyzing mobility in agarose and polyacrylamide perfectly adjusted allowing for substitution of agarose by polyacrylamide.

Key words: Human Papillomavirus typing. Electrophoresis. PCR-RFLP. Polyacrylamide gel.

INTRODUCCIÓN

Se ha determinado que el virus del papiloma humano (VPH) es el agente etiológico del cáncer de cuello uterino (1) de manera que su detección y tipificación se hace imprescindible dentro de los esquemas epidemiológicos de control del virus (2). La detección y tipificación ha sido abordada por varios métodos tanto inmunológicos como moleculares (3), dentro de los ensayos inmunológicos destaca el ensayo de captura de híbridos, el INNO LiPA, pruebas ELISA y variantes de estos que tienen la ventaja de no solo estar reconocidos por la FDA, sino que son de fácil aplicación, pero en su contra está el alto costo de estas pruebas (4). Los métodos moleculares involucran la utilización de técnicas de biología molecular entre ellas todas las variantes de la reacción de cadena de la polimerasa (PCR) (5). En la década de los años 80 Manos y col. (6) desarrollaron el sistema de oligonucleótidos degenerados MY09/MY11 para la amplificación de un fragmento de 450 pb aproximadamente, una de las ventajas de este sistema es que se hizo posible la amplificación de más de 100 tipos diferentes de VPH, permitiendo la detección de nuevos tipos virales (7). La tipificación del virus presenta el problema del gran número de tipos virales; este problema ha sido abordado con distintas técnicas de biología molecular como PCR-RFLP, PCR-RAPID, PCR-SSCP, sistemas oligonucleótido específico, secuenciamiento entre otras. La PCR-RFLP se ha convertido en una de las herramientas más comunes utilizadas para la tipificación (8). Se han utilizado baterías de enzimas de restricción, basados en la diferencia nucleotídica de los amplificados MY09/MY11, poder diferenciar entre los diferentes tipos virales (9). En años recientes se propuso la utilización de la enzima HpyCH4V como una enzima única, dada la secuencia de reconocimiento de esta, para la tipificación por reacción de digestión enzimática (10). Una de las dificultades para la utilización de esta enzima de forma masiva es el sistema electroforético propuesto por estos autores, la clásica electroforesis vertical en matriz de poliacrilamida, la cual presenta una serie de dificultades metodológicas que no permite la competencia con los sistemas de electroforesis horizontal con geles de agarosa. Se propone una metodología sencilla de rápida aplicación y preparación de geles de poliacrilamida en sistemas de electroforesis horizontal que permita la diferenciación clara de los distintos tipos de VPH utilizando la enzima

HpyCH4V. La disminución de costos a nivel de la tipificación del virus ayudará a la implementación de la prueba molecular y su introducción en los esquemas epidemiológicos, aplicados a la población de mayor riesgo.

MÉTODOS

Es un estudio descriptivo de tipo experimental. Se utilizó el ADN de 17 tipos diferentes de VPH clonados en el plásmido pGEM-T (Promega), de la región L1, de la colección genómica del Laboratorio de Biología y Medicina Experimental LABIOMEX-ULA (11). Se realizó la reacción PCR para amplificar la región MY09/MY11 de aproximadamente 450 pb según el protocolo de Manos y col. (6). La mezcla de reacción consistió en tampón de PCR 1X, 2.0 mM de MgCl₂, 200 μM de dNTPs, 25 pmoles de cada uno de los iniciadores y 0,5U de Taq polimerasa (Invitrogen). Para las reacciones se utilizó un termociclador Eppendorf *Mastercycler ep gradient S* con el siguiente programa de amplificación: 1 min a 94 °C, 30 seg a 44 °C y 30 seg a 72 °C. El producto de la amplificación se sometió a digestión enzimática con la enzima de restricción HpyCH4V de *New England Biolabs* según el protocolo de Santiago y col. (10). El producto de digestión se corrió en geles de poliacrilamida 29:1 acrilamida-bisacrilamida en tampón tris-acetato-EDTA (TAE) 0,5 %, se utilizó una solución de persulfato de amonio para una concentración final de 10 %, se agregaron 0,08 mL de TEMED para un volumen final del gel de 25 mL (12). Los geles fueron preparados en un equipo de electroforesis Thermo Minicell Primo con un tamaño de 8X6,5 cm. Utilizando un peine de 13 pozos de un volumen máximo de 10 microlitros, la mezcla para un volumen final de 25 mL y una concentración final de poliacrilamida de 6 %. La corrida electroforética se realizó a un voltaje constante de 120V con una fuente de poder Thermo EC4000p, las muestras fueron mezcladas con tampón de carga (12). Como tampón de corrida utilizó TAE 0,5 % volumen suficiente para sumergir el gel. Se utilizó una escalera de peso molecular de 50 pb *New England Biolabs*. Se sembraron 5 microlitros del digerido por pozo y se corrió por un tiempo de 45 minutos. Una vez finalizada la corrida se procedió a teñir el gel con una solución de Bromuro de Etidio marca Sigma al 0,0001 % en agua destilada por 10 minutos

luego de lo cual se sumergió en agua destilada por otros 10 minutos. Se visualizaron las bandas con la ayuda de un transiluminador de luz U.V. (UVP®) a una longitud de onda de 302 nm. Los geles fueron fotografiados con un equipo de fotodocumentación (UPV® PhotoDoc-It). Las fotos digitalizadas se visualizaron utilizando el programa CannonUtilitis Windows versión 1.0.0. Se realizó un análisis virtual con el programa NetCutter 2.0 de New Englan Biolab de acceso gratuito con la finalidad de comparar los resultados experimentales con el análisis virtual (13). Se realizó un análisis de movilidad electroforética comparando corridas en geles de agarosa al 2 % y geles de poliacrilamida (29:1) 6 % para ello se utilizó la escalera de 50 pb de *New England Biolabs*, se

calculó el valor de ajuste de estas curvas obteniendo el R² de las gráficas exponenciales.

RESULTADOS

En la Figura 1 podemos observar las corridas individuales de los 17 VPHs analizados. Cada corrida se acompaña de una escalera de 50 pb New England Biolabs para su análisis. Utilizando las fotografías obtenidas se calcularon los valores de movilidad relativa (MR) correspondientes a cada corrida, estos valores se comparan con los valores virtuales obtenidos anteriormente (Cuadro 1). Los valores de tamaño

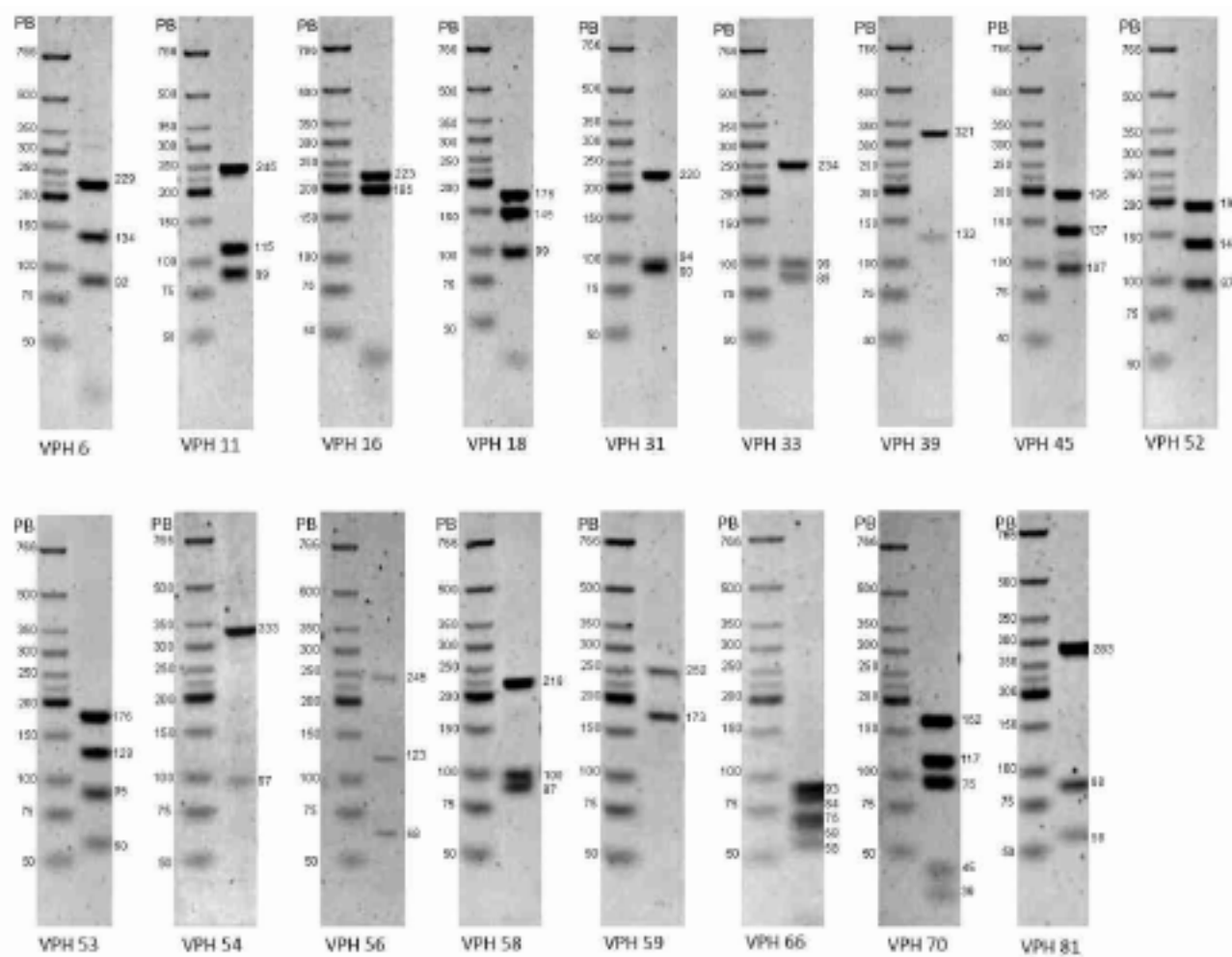


Figura 1. Composición fotográfica de la electroforesis en poliacrilamida de 17 tipos de VPH donde se señala los valores en pares de bases (pb) tanto para la escalera de 50 pb de *New Englan BioLab* como los valores calculados de movilidad relativa (MR) de los productos de digestión del amplificador MY09/MY11 con la enzima de restricción HpyCH4V.

ELECTROFORESIS HORIZONTAL EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Cuadro 1

Se presentan los valores en pares de bases [pb] productos de digestión de los amplificadores MY09/MY11 obtenidos por digestión virtual (V) y por análisis de los productos de las corridas en geles de acrilamida a través de cálculo de la movilidad relativa de los fragmentos productos de la digestión con HpyCH4V (MR)

Tipo viral	VPH6		VPH11		VPH16		VPH18		VPH31		VPH33		VPH39		VPH45		VPH52	
	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR
Digestión	224	229	244	245	216	223	174	176	214	220	244	234	328	321	194	196	188	190
con																		
HpyCH4V	134	134	114	115	191	195	144	145	94	94	99	101	127	132	133	137	135	140
(pb)	91	92	91	89			100	99	91	90	89	81			177	107	98	97
Tipo viral	VPH53		VPH54		VPH56		VPH58		VPH59		VPH66		VPH70		VPH81			
	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR	V	MR		
Digestión	171	176	330	333	244	245	216	218	253	252	91	93	162	162	284	283		
con																		
HpyCH4V	127	112	91	97	121	123	99	100	174	173	84	84	116	117	59	88		
(pb)	91	95			67	68	89	87			72	76	77	75	47	58		
	54	60									66	68	45	45				
											58	58	36	36				

señalados en las fotografía corresponden a los valores calculados de MR para cada tipo viral. El cálculo se realizó utilizando la hoja estadística Microsoft Excel 2010 para cada uno de los 17 tipos de VPH analizados, el ajuste de todas las curvas (R^2) estuvo entre el 0,97 y el 0,99 (curvas no mostradas). Se pueden observar patrones electroforéticos característicos para cada tipo de VPH analizado, solo en el caso de VPH 45 y 52 que presentan patrones similares imposible de definir en este sistema, ambos VPH son de alto riesgo y su determinación es indiferente para el diagnóstico clínico. En la Figura 2 podemos observar la relación entre longitud del fragmento de ADN y la distancia recorrida en una matriz como es el caso de la agarosa y la poliacrilamida. La gráfica indica que la electroforesis en ambas matrices presenta un comportamiento similar, ajustándose de manera eficiente a la regresión exponencial. Ambos valores de R^2 demuestran un ajuste de 0,9914 para la corrida en agarosa 2 % y de 0,9858 para poliacrilamida. Estos valores reflejan una excelente correlación entre las variables estudiadas.

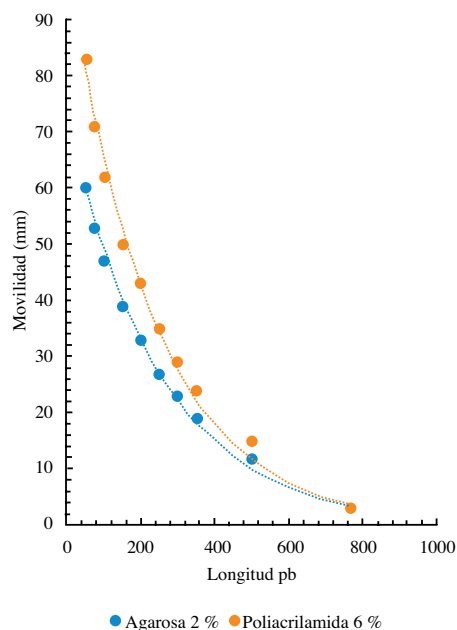


Figura 2. Movilidad electroforética. En la gráfica se comparan las movilidades del ADN doble banda en geles de agarosa al 2 % y en acrilamida (29:1) 6%. Los valores de ajuste (R^2) para ambas curvas es de 0,9914 para agarosa y de 0,9856 para acrilamida. Los valores fueron ajustados para su graficación. La corrida en agarosa tuvo una longitud total de 8 cm mientras que la corrida en poliacrilamida una corrida de 4 cm. El ADN utilizado para las curvas fue la escalera de 50 pb de *New England BioLab*.

DISCUSIÓN

Los geles horizontales de acrilamida han demostrado ser una herramienta eficiente para el análisis de fragmentos de ADN entre 50 pb y 800 pb intervalo que corresponde a los productos de digestión del fragmento MY09/MY11 de aproximadamente 450pb por la enzima HpyCH4V, los resultados presentados nos permiten distinguir entre 17 tipos de VPH diferentes, con la excepción de los tipos 45 y 52 que en este sistema no se pueden diferenciar, no obstante estos tipos virales son ambos de alto riesgo y para el tratamiento clínico es indiferente su tipificación. Los índices de correlación obtenidos para las electroforesis tanto en agarosa como en poliacrilamida validan la utilización de esta última como un sustituto de la agarosa, por otra parte las corridas electroforéticas en poliacrilamida presentan una mayor definición en corridas de hasta 2,5 cm en comparación con corridas de 8 cm en agarosa, esto permite realizar más de un sistema simultáneo de análisis en un mismo gel estándar de 8 cm de longitud. El mismo índice de correlación nos indica que los tamaños calculados con base en el análisis exponencial se ajustan a la realidad. En el Cuadro 1 podemos ver lo poco que difieren los valores calculados mediante la regresión exponencial (movilidad relativa) y los esperados por análisis informático utilizando el Programa NebCutter 2.0 (13). La utilización de la región MY09/MY11 ha permitido no solo la tipificación de los distintos tipos de VPH sino estudios de relación filogenética del virus (14), su clasificación y evolución (7).

REFERENCIAS

- Zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:690-698.
- Quintero V, Cruz J, Bastidas M, Márquez L, Pons P. Detección y tipificación del virus del papiloma humano (VPH) mediante PCR-RFLP. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2008;68:25-31.
- Abreu A, Souza R, Giménez F, Consolaro M. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology J.* 2012;9:262.
- van Hamont D, van Ham M, Bakkers J, Massuger L, Melchers W. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA Human papillomavirus (HPV) Genotyping Test and the Roche Linear Array HPV Genotyping Test. *J Clin Micro.* 2006;3122-3129.
- Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res.* 1991;82:524-531.
- Manos M, Ting Y, Wright D, Lewis A, Broker T, Wolinsky S. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cell.* 1989;7(17):209-214.
- De Villiers E, Fauquet C, Broker T, Bernard H, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virol.* 2004;324:17-27.
- Molijn A, Kleter B, Quint W, Van Doorn L. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol.* 2005;32S,S43-S51.
- Resnick R, Cornelissen E, Wright D, Eichinger G, Fox, Schegget J, et al. Detection and typing of Human Papillomavirus in Archival Cervical Cancer Specimens by DNA Amplification with Consensus Primers. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(18):1477-1484.
- Santiago E, Camacho L, Junquera M, Vázquez F. Full HPV typing by a single restriction enzyme. *J Clin Virol.* 2006;37:38-46.
- Fernández L. Clonamiento y secuenciación parcial de la proteína L1 de diferentes virus del papiloma humano encontrados en el Estado Mérida, Venezuela. 2009 Memoria para optar por el grado de Magister scientisae en Biología Molecular. Universidad de Los Andes. Labiomex.
- Zimm B, Levene D. Problems and prospects in the theory of gel electrophoresis of DNA. *Quarterly Reviews of Biophysics.* 25, 1992:171-204.
- Vincze T, Posfai J, Roberts R. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research.* 2003;31(13):3688-3691.
- Cruz J, Márquez L, Quintero M, Bastidas M, Puig J. Estudio de variantes intra-tipo del virus del papiloma humano tipo16, por análisis nucleotídico de la región MY09-MY11. *Rev Obstet Ginecol Venez.* 2013;73(3):187-194.