

Iniciadores utilizados en la identificación de virus de papiloma humano por PCR: una revisión

Primers used in the identification of Human Papillomavirus by PCR: a review

- ¹ Felix Falconi Ontaneda  <https://orcid.org/0000-0003-3825-5271>
Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Chimborazo, Ecuador
ffalconi@unach.edu.ec
- ² José Zaporta Ramos  <https://orcid.org/0000-0002-5509-1160>
Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Chimborazo, Ecuador
andres.zaporta@epoch.edu.ec
- ³ Yisela Carolina Ramos Campi  <https://orcid.org/0000-0002-2403-4139>
Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Chimborazo, Ecuador
yramos@unach.edu.ec
- ⁴ Gisnella María Cedeño Cajas  <https://orcid.org/0000-0001-7452-8762>
Carrera de Laboratorio Clínico, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Nacional de Chimborazo, Chimborazo, Ecuador
gcedeno@unach.edu.ec



Artículo de Investigación Científica y Tecnológica

Enviado: 27/10/2023

Revisado: 23/11/2023

Aceptado: 15/12/2023

Publicado: 28/12/2023

DOI: <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i4.3.2830>

Cítese:

Falconi Ontaneda, F., Zaporta Ramos, J., Ramos Campi, Y. C., & Cedeño Cajas, G. M. (2023). Iniciadores utilizados en la identificación de virus de papiloma humano por PCR: una revisión. *Anatomía Digital*, 6(4.3), 707-726. <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i4.3.2830>



ANATOMÍA DIGITAL, es una Revista Electrónica, Trimestral, que se publicará en soporte electrónico tiene como misión contribuir a la formación de profesionales competentes con visión humanística y crítica que sean capaces de exponer sus resultados investigativos y científicos en la misma medida que se promueva mediante su intervención cambios positivos en la sociedad. <https://anatomiadigital.org>
La revista es editada por la Editorial Ciencia Digital (Editorial de prestigio registrada en la Cámara Ecuatoriana de Libro con No de Afiliación 663) www.celibro.org.ec

Esta revista está protegida bajo una licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 International. Copia de la licencia: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/deed.es>

Palabras claves:

VPH, PCR,
iniciadores, diseño
de iniciadores,
bioinformática

Resumen

Introducción La infección por el virus del papiloma humano (VPH) sigue siendo una de las más comunes en la población humana. Este virus cuenta con aproximadamente 200 genotipos diferentes, que se clasifican en términos de su capacidad oncogénica en alto y bajo riesgo. La identificación de estos genotipos se ha realizado mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la cual requiere el uso de iniciadores específicos para garantizar resultados precisos. **Objetivo.** Recopilar secuencias de iniciadores publicados, analizarlos y organizar esta información para proveer una lista compilada que facilite la decisión de optar por la utilización de un par de iniciadores requeridos para la detección y diagnóstico del HPV. **Metodología.** Se aplicó un enfoque cualitativo, de alcance descriptivo y con un diseño transversal teórico-documental, puesto que se analizó y sintetizó la literatura actualizada extraída de artículos científicos, relacionados con el tema de investigación, –los cuales permitieron profundizar la investigación y cumplir con los objetivos planteados. Se revisaron varios artículos de publicación reciente que refieren los iniciadores utilizados. **Resultados.** Se muestran 17 iniciadores útiles para las variantes de alto riesgo 17 y 15 para las variantes 18, así como para otras variantes. Se expone de manera organizada diferentes aspectos a destacar en su análisis, así como características a tomar en cuenta para su diseño. Además, se mencionan las herramientas de análisis de secuencias las directrices y parámetros requeridos a considerar para asegurar una buena reacción de PCR. Es muy conveniente tomar en cuenta la clasificación taxonómica y estructura del VPH que permite comprender la utilización de un iniciador para un determinado gen del virus. Al momento de necesitar utilizar un determinado iniciador se sugiere tomar en cuenta los más convenientes según los valores obtenidos por las herramientas bioinformáticas y a los autores quienes probaron y publicaron secuencias de detección por PCR. **Conclusión.** Se muestran 17 iniciadores útiles para las variantes de alto riesgo 16 y 15 para las variantes 18, además de 8 para otros tipos. Además, se muestran parámetros de cada uno que permite tener criterios para decidir su selección. **Área de estudio general:**

Salud. **Área de estudio específica:** Biología molecular. **Tipo de estudio:** Artículo de revisión.

Keywords:

HPV, PCR, primers, primer design, bioinformatics

Abstract**Introduction.**

Human papillomavirus (HPV) infection remains one of the most common infections in the human population. This virus has approximately 200 different genotypes, which are classified in terms of their oncogenic capacity into high and low risk. The identification of these genotypes has been carried out using the polymerase chain reaction (PCR) technique, which requires the use of specific primers to guarantee accurate results. **Methodology.** A qualitative approach was applied, with a descriptive scope and a transversal theoretical-documentary design, since the updated literature extracted from scientific articles related to the research topic was analyzed and synthesized, which allowed the research to be deepened and the objectives met. raised. Several recently published articles that refer to the initiators used were reviewed. **Results.** Shown are 17 useful primers for high-risk variants 17 and 15 for variants 18, as well as other variants. Different aspects to highlight in its analysis are presented in an organized manner, as well as characteristics to take into account for its design. In addition, sequence analysis tools, guidelines and required parameters to consider to ensure a good PCR reaction are mentioned. It is very convenient to take into account the taxonomic classification and structure of HPV that allows us to understand the use of a primer for a certain gene of the virus. When needing to use a certain primer, it is suggested to take into account the most convenient ones according to the values obtained by the bioinformatics tools and the authors who tested and published PCR detection sequences. **Conclusion** Shown are 17 useful primers for high-risk variants 16 and 15 for variants 18, plus 8 for other types. In addition, parameters for each one are shown that allow you to have criteria to decide your selection. **General Study Area:** Health. **Specific area of study:** Molecular biology. **Study type:** Review article.

Introducción

La infección por virus papiloma humano (VPH) continúa siendo de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más comunes en la población humana. Se han identificado aproximadamente 200 genotipos diferentes de VPH, y se los clasifica en dos categorías: VPH de alto riesgo (VPH-AR) y VPH de bajo riesgo (VPH-BR), en función de su capacidad oncogénica (1, 2).

Los genotipos de alto riesgo corresponden a VPH 16,18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82 (2, 3) y los de bajo riesgo incluyen a los genotipos VPH 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 y CP6108 (3, 4). No obstante, acorde a diferentes estudios, las variantes VPH 16 y VPH 18 son los genotipos más prevalentes, con altos porcentajes en las lesiones precancerosas y cáncer de cuello uterino (CCU) considerado como el tercer motivo de cáncer más frecuente en mujeres en todo el mundo, sobre todo en los países en vías de desarrollo (5, 6), por esta razón es el principal motivo de investigación epidemiológica y del desarrollo de vacunas.

Estructuralmente el HPV tiene genoma de ADN (ácido desoxirribonucleico) circular de doble cadena con un tamaño de 8 kb, dividiéndose funcionalmente en tres regiones diferentes: la región temprana (E = early), la región tardía (L= late), y la región larga de control LCR (Long Control Region). La región E está conformada por los genes E1 y E2 que regulan la replicación y la transcripción viral, constituida por los genes E5, E6 y E7 codifican proteínas con alto poder oncogénico (7), en la región larga de control LCR se localizan las secuencias de ADN que contienen los promotores y sitios de iniciación de replicación del genoma viral y la región L conformada por los genes estructurales L1 y L2 codificantes de proteínas de la cápside (8-11).

La clasificación de los virus del papiloma humano (HPV) se basa en el análisis de la secuencia de nucleótidos del gen viral L1 debido a su alta conservación. De esta manera, se identifica un nuevo tipo viral cuando su secuencia difiere en más de un 10% de los tipos ya conocidos, se clasifica como subtipo si la diferencia se sitúa entre el 2% y el 10%, y se considera una variante intratípica si la divergencia es inferior al 2%. Los primeros estudios de variabilidad genética se llevaron a cabo con el HPV 16, ya que es el tipo de virus de alto riesgo más prevalente en el cáncer de cuello uterino a nivel mundial, y esta investigación continúa avanzando en la actualidad (12). Por comparación de secuencias en la región LCR de distintos aislados virales se creó el primer árbol filogenético para los diferentes continentes, resultando en varias subclasificaciones: A, B, C y D para HPV 16 dentro de las variantes se tiene las africanas (Af-1 y Af-2), asiática-americana (AA), europea (E), asiática (As) y norteamericanas (NA), quedando el clon referencial dentro de la rama E. Del mismo modo se ha aplicado para las variantes de HPV 18 teniendo A, B y C como linajes, mostrado en tres ramas: europea (E), africana (Af) y asiático-amerindia (AAI) (13-15).

Posteriormente también se analizaron los genes virales L1 y L2 y los oncogenes virales E6 y E7 con lo que ha encontrado que las diferencias de la secuencia nucleotídica en estos genes podrían vincularse con cambios en la respuesta inmune del hospedador y en el potencial oncogénico, respectivamente y se ha observado una fuerte covariación intergenética, sugiriendo que las diferencias nucleotídicas halladas en la región genómica pueden usarse para distinguir los distintos linajes de HPV (16, 17). Concretamente de los 16 géneros de la familia *Papillomavirus*, únicamente cinco (5) infectan a seres humanos, éstos son: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* y *Nupapillomavirus*, que conforman la clasificación no taxonómica de "virus del papiloma humano" (10, 18, 19).

Los métodos moleculares de detección y/o identificación del ADN de VPH disponibles son: Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) y Sistema de Captura de Híbridos (SCH). La PCR puede utilizarse con técnicas de hibridación o con la producción de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP) a partir de los productos de amplificación para la tipificación viral (18, 19).

La PCR es una técnica in vitro utilizada para amplificar enzimáticamente una región específica de ADN de interés. Esta región es limitada por dos moléculas llamadas iniciadores, que son fragmentos cortos de nucleótidos que se hibridan por complementariedad a la secuencia molde del genoma problema. A partir de los iniciadores se genera una nueva cadena mostrándose como resultado una amplificación de copias de esa región de tamaño específico (amplicon) (20). El tamaño de los amplicones obtenidos de la muestra, tiene un efecto inverso sobre la eficacia de la PCR, recomendándose que no sea superior a 200 pb.

En la actualidad, varios iniciadores de diferentes genes de VPH han sido diseñados, pero las más comunes se basan en el gen L1 (21); no obstante también se han publicado la secuencia de los iniciadores para las otras regiones mencionadas.

El propósito de este trabajo fue recopilar secuencias de iniciadores publicados, analizarlos y organizar esta información para proveer una lista compilada que facilite la decisión de optar por la utilización de un par de iniciadores requeridos para la detección y diagnóstico del HPV.

Para que se lleve a cabo exitosamente la PCR es primordial que los iniciadores sean específicos. Estos iniciadores, actúan como punto de partida y unión para la ADN polimerasa durante la síntesis de ADN del fragmento a amplificar. Cada iniciador es complementario a una de las cadenas del ADN en estudio, uno de los iniciadores debe tener la misma secuencia que se encuentra en una de las cadenas del ADN (iniciador sentido) y el otro deberá tener la secuencia complementaria que estará al final del fragmento que se quiere amplificar (iniciador antisentido) (22).

Previo a la realización de la reacción es indispensable analizar la secuencia de cada iniciador.

Este análisis se lleva a cabo con herramientas bioinformáticas diseñadas para este fin. Antes de realizar el análisis de los iniciadores sentido y antisentido, es indispensable conocer los requisitos que dichos iniciadores deben cumplir para ser considerados como óptimos y así poder utilizarlos para la reacción de PCR (23).

Características de iniciadores

Longitud del iniciador

Cada iniciador sentido y antisentido debe contar con una longitud de entre 18-24 bases, ya que la cantidad de bases influye en la especificidad de la secuencia a amplificar, siempre y cuando la temperatura de alineamiento (temperatura calculada, a partir de la cual se realizan los ensayos necesarios) haya sido probada como adecuada. La longitud del iniciador influye en la eficiencia del alineamiento, cuanto más largo sea el iniciador, menos eficaz será la alineación. Al unirse una menor cantidad de iniciador a la secuencia de ADN molde en cada ciclo, se tiene como consecuencia la disminución de la cantidad del producto amplificado de forma significativa. Sin embargo, los iniciadores no deben ser demasiado cortos, ya que pueden llegar a unirse de forma inespecífica. Esto tiene como consecuencia, amplificados de productos no deseados y una disminución del producto de interés (23).

Especificidad

Los iniciadores, deben ser específicos para delimitar la región que se quiere amplificar y esta condición depende al menos en parte de su longitud, por lo que deben elegirse de forma que tengan una secuencia única dentro del ADN a amplificar. La ADN-polimerasa puede activarse a diferentes temperaturas, la extensión del iniciador se produce a una temperatura inferior a la de alineamiento, pero si es demasiado baja, puede darse un alineamiento inespecífico por lo que una buena recomendación se obtiene con una temperatura de fusión de entre 55 a 72°C, que corresponde a una longitud del iniciador de entre 18 y 24 bases (23).

Temperatura de fusión (Tf o Tm)

La Tf (Temperatura de fusión) es la temperatura a la que la mitad de las hebras de ADN se encuentran como banda simple y la mitad como banda doble. Se sugiere que los iniciadores tengan Tf similares o muy próximas, con 5 °C de diferencia como máximo de lo contrario el resultado sería menos eficaz e incluso puede no llevarse a cabo la amplificación. Esto es porque si el iniciador con la Tf mayor, funciona mal a temperaturas más bajas y el iniciador con la Tf más baja, no se une a temperaturas más

elevadas. Por esto se recomienda analizar los iniciadores por medio de herramienta bioinformáticas que indican la Tf de cada uno de ellos. De manera común se ha calculado la Tf por medio de la fórmula $Tf = 4 \text{ (Guanina+Citocina)} + 2 \text{ (Adenina+Timina)}$, que resulta en una buena aproximación del valor de Tf de cada iniciador y se aplica para iniciadores de entre 18 y 24 bases, siendo disponible varios sitios de internet en el que se puede realizar este cálculo. De esta manera, la Tf estará entre 56 – 62 °C (24).

Temperatura de alineamiento

En cuanto a la temperatura de alineamiento se sugiere que los iniciadores tengan al menos 50 °C; la relación entre temperatura de alineamiento y temperatura de fusión corresponde a la temperatura de alineamiento inferior en 5 °C a la temperatura de fusión ($T \text{ alineamiento} = Tf \text{ iniciador} - 5 \text{ °C}$).

No obstante, esta temperatura sirve de referencia, puesto que es posible que la temperatura de alineamiento determinada empleando esta regla no sea la apropiada y se tengan que efectuar varios ensayos para determinar la temperatura óptima de la reacción.

En un termociclador de gradiente, se puede probar en un solo ensayo varias temperaturas y así determinar la temperatura óptima de una reacción. Una T alineamiento alta, evita la unión de los iniciadores y una T alineamiento baja, permite unión inespecífica de los iniciadores, obteniéndose tamaños diversos de amplicados que se observan como amplicones inespecíficos.

Secuencias complementarias del iniciador

Puede haber secuencias de iniciadores que tienen ciertas regiones con capacidad para formar estructuras secundarias internas (dímeros), por complementariedad entre ellos o formación de horquillas (por tener zonas de auto homología), por lo tanto, esto debe evitarse. Se recomienda revisar, que los iniciadores no presenten secuencias con homología interna de más de tres pares de bases, y si presentan homología parcial en las regiones centrales, así como, en el extremo 3' de cualquiera de los iniciadores, pueden formar dímeros de iniciadores, que en general interfieren con el alineamiento al ADN molde e impiden la formación del producto deseado por un mecanismo de competencia (25).

Contenido de G/C y tramos de polipirimidina (T, C) o polipurina (A, G)

Se ha sugerido que el contenido de G:C (Guanina: Citocina) debe estar en el rango de entre 40 y 55%. Mientras más cantidad de G y C tenga el iniciador, mayor será Tf. Por otro lado, también se deben evitar secuencias de poli X (X= G o C o T o A), en el caso

de tener poli G o poli C esto favorecería una hibridación inespecífica, en tanto que las secuencias de poli-A y poli-T, tramos de polipirimidinas (T, C) y polipurinas (A, G) pueden reducir la eficacia de la amplificación. Se recomienda que los iniciadores tengan una mezcla diversa de nucleótidos con un contenido de GC del 50 %, que conserve la T_f apropiada. y una longitud aproximada de 20 bases.

Secuencia en el extremo 3'

Un punto importante es la inclusión de un residuo de G o C en el extremo 3' de los iniciadores. Extremos 3', debido a que los triples enlaces que forman estas bases favorecen la eficacia de la reacción ya que minimizan la posibilidad de que se abra la doble cadena formada entre el iniciador y el ADN a amplificar (23).

Análisis de iniciadores

Los iniciadores deben someterse previamente a análisis adecuado, caso contrario puede obtenerse poco producto, productos inespecíficos o incluso ningún producto, dado por una amplificación inespecífica y/o por la formación de dímeros de iniciadores que compiten durante la reacción.

Para realizar el análisis de iniciadores se utilizan herramientas bioinformáticas gratuitas que se encuentran en línea. Con estas herramientas bioinformáticas, podemos contrastar las secuencias de los iniciadores contra bases de datos y así caracterizarlos. Con los resultados obtenidos del análisis, determinamos si los iniciadores analizados son adecuados o no, para realizar la reacción de PCR en el laboratorio (22).

Herramientas bioinformáticas

Para el análisis de biomoléculas se disponen de varias herramientas bioinformáticas que se pueden utilizar en especial para obtener datos de la composición y con ello encontrar sitios de interés para la detección por técnicas moleculares. Estas plataformas tienen bases de datos con las que además de obtener la secuencia de moléculas que conforma el genoma del microorganismo, se pueden realizar análisis de homología de secuencias muy requeridas en el diseño de los iniciadores. Con estas herramientas se puede tomar una decisión de la utilización de algún par de iniciadores para la reacción por PCR.

El desarrollo y optimización de las herramientas bioinformáticas para el análisis de iniciadores, así como la utilización de bases de datos (BLAST, Clustal Omega, FASTA, M-Coffee, PRALINE, Online Analysis Tools, Omic Tools, Repeat Masker, Sequence Manipulation Suite SMS, SILVA, uniprot), ayudan al análisis de iniciadores para verificar si son altamente específicos, que conduzcan en definitiva a obtener un resultado exitoso.

Metodología

Este trabajo consistió en una revisión bibliográfica, se aplicó un enfoque cualitativo, de alcance descriptivo y con un diseño transversal teórico-documental, puesto que se analizó y sintetizó de literatura actualizada extraída de bases de datos de investigación orientada en el área de la biología molecular. Para encontrar las publicaciones se hizo uso de palabras clave y conectores de búsqueda, acorde a los objetivos planteados. Dichas publicaciones fueron obtenidas de buscadores y bases de datos académicas como Pubmed, Academic Google, Elsevier, y Scielo.

Se tomó en cuenta documentación de alta complejidad, actualizada y relevante que pueda solventar las inquietudes planteadas y el alcance de esta investigación.

Los artículos revisados fueron trabajos de publicación reciente (años 2020 -2023) que implicaban los iniciadores utilizados en la detección de VPH según sea éste de alto o bajo riesgo y seleccionando los artículos donde se describe la aplicación de la PCR mostrando los iniciadores utilizados pero que no sean de tipo aleatorio y con un año de publicación no mayor a 5 años. Para la recolección de los datos se usó como técnica la observación de las mejores fuentes de primera mano y para organizar la información se utilizó una hoja de cálculo de Excel en la que se registraron los datos específicos requeridos para disponer de una base de datos.

Se organizó en una tabla los iniciadores para VPH de tipo 16, 18, 31, 33, 52, 53 categorizados dentro de los tipos de alto riesgo, así como también los de 45, 58 y el común MY09/MY11 acorde a lo publicado por los autores. tomados en cuenta en este trabajo. Se verificó la existencia en la secuencia genómica del VPH que consta en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information). Luego cada iniciador fue revisado con varias aplicaciones bioinformáticas disponibles en la red diseñadas para este propósito, no obstante, fue con la aplicación MFEprimer que se obtuvo la mayoría de los resultados. Otros datos fueron directamente tomados de lo publicado por los autores. Los valores de los parámetros que se evidenciaron fueron: tamaño del iniciador, contenido GC (%), energía libre de Gibbs (ΔG (kcal/mol)), base en el extremo 3', promedio de la temperatura de alineamiento (T_m) y amplicon en pares de bases (pb).

Para orientar el trabajo que corresponde hacer cuando se requiere analizar la calidad de los iniciadores se elaboró tablas que exponen las bases de datos útiles en estos casos, los tipos de iniciadores, las características y criterios que se tienen que tomar en cuenta cuando se diseñan los iniciadores, las herramientas bioinformáticas útiles en el análisis de iniciadores, los iniciadores encontrados en las publicaciones, y los cálculos de los parámetros cuyos valores son decisivos para la selección apropiada del iniciador. En este sentido, el propósito de este trabajo fue recopilar secuencias de iniciadores

publicadas, analizarlos y organizarlos para proveer una lista compilada que facilite la decisión de optar por la utilización de un par de iniciadores requeridos para la detección y diagnóstico del HPV, sirviendo para diferentes versiones de PCR que le sea útil.

Resultados

La selección de oligonucleótidos iniciadores se tiene que tomar en cuenta parámetros muy importantes para que se produzca una buena reacción de PCR, adecuada hibridación con sondas y en caso de secuenciación de ADN. Por lo tanto, de este paso depende el éxito de la detección del virus en el laboratorio con técnicas moleculares. En este sentido es necesario distinguir el tipo de iniciador que se va a usar (Tabla 1)(26).

Tabla 1: Tipos de iniciador para PCR

Iniciadores	Descripción
Universales	Son secuencias únicas, se utilizan para amplificar un gen similar que está relacionado con un género específico.
Específicos	Amplifican solo de un tipo de secuencia diana, es decir no pueden amplificar una región que no sea su complemento. Se complementan a una región específica por ejemplo de un virus para poder detectarlo con la amplificación.
Degenerados	Tienen secuencias similares, pero no exactamente igual, amplifican el mismo gen incluso en diferentes organismos, por lo cual pueden ayudar a estudiar las variaciones de una especie
Anidados	Están constituidos por cuatro iniciadores, con un primer par de iniciadores se consigue un primer amplicón que luego éste sirve de plantilla para una segunda corrida de PCR, encontrando su sitio diana en su interior.

Fuente: Guevara K., 2022 (26)

Cada uno de este tipo de iniciadores tiene que ser consideración en base a criterios de su composición que deben ser también tomados en cuenta

Tabla 2: Criterios a tomar en cuenta al diseñar los iniciadores

Características	Criterios
Tamaño	De 20-25 nucleótidos (tamaño ideal) De 18-30 nucleótidos (Tamaño general)
Base en el extremo 3'	Debe ser una Guanina (G) o una citosina (C)
Temperaturas de fusión (Tm)	Entre 50 a 60°C
Contenido GC	Entre 40 al 60%
Autocomplementariedad	Debe ser evitada y así impedir la formación de estructuras secundarias y dímeros entre iniciadores.
Similaridad	Debe tener un 100% de apareamiento con el molde

Fuente:

<http://bioinf.ibun.unal.edu.co/documentos/primers/primer.php#PCR%20o%20para%20Secuenciaci>

Como puede observarse hay cierta variación en las recomendaciones respecto al tamaño de los iniciadores esto ha dependido de la experiencia de los resultados obtenidos por los investigadores. Mientras mayor es el tamaño del iniciador será más específico la

identificación. Así mismo, los extremos al final del iniciador son necesarios para que las polimerasas agreguen nucleótidos para elongar la cadena, en este sentido es útil que los nucleótidos de Guanina o citocina son útiles por tener mayor estabilidad en la cadena razón por la cual se toma en cuenta este parámetro. Por último, se debe verificar que el iniciador contenga ciertas secuencias que permita la autocomplementariedad y más bien sea complementario con la cadena molde del ADN de la muestra (27).

Con estos antecedentes se revisaron varios artículos y se tomaron en cuenta los iniciadores publicados, estos se verificaron en aplicaciones dispuestas en plataformas y utilitarios para el análisis de los mismos mostrados en la tabla 3 de los cuales el que más información directa resultó fue MFEprimer (28).

Tabla 3: Herramientas bioinformáticas útiles para el análisis de iniciadores para PCR.

Aplicación	Descripción	sitio
TM TOOLSM	Para determinar la Tm en base a la concentración y composición de las sales componentes del tampón	https://dna-utah.org/tm/tool.html
In-Silico PCR	Para validación del iniciador	http://rohshdb.cmb.usc.edu/GBshape/cgi-bin/hgPcr
MFEprimer	“programa rápido basado en termodinámica para comprobar la especificidad del cebador de PCR”	https://mfeprimer3.igenetech.com/spec
AutoDimer	Desarrollado “para detectar rápidamente cebadores de PCR previamente seleccionados para detectar interacciones cebador-dímero y horquilla en oligómeros de ADN cortos (<30 nucleótidos)”	https://autodimerv1.softwareformer.com/
IDT, Integrated DNA Technologies, In	Plataforma dedicada a solventar requerimiento de secuencias genéticas oligonucleotídicas y su análisis	https://www.idtdna.com/pages
Primer3plus	“Utilizado ampliamente para el diseño de cebadores, a menudo en aplicaciones genómicas de alto rendimiento”	https://www.primer3plus.com/
Nucleotide-BLAST	Para “alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas”	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
SNPCheck	Busca de interferencias de SNP	https://secure.ngri.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm

Tabla 3: Herramientas bioinformáticas útiles para el análisis de iniciadores para PCR. (continuación)

Aplicación	Descripción	sitio
Primer-Blast	Para diseñar iniciadores específicos para la cadena molde	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?GROUP_TARGET=on
Oligo Calc	Para cálculo de varios parámetros	http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html

Fuente: Falconi F. et al. 2023

Se obtuvieron 31 pares de iniciadores para HPV, 17 para los de la variante 16 y 15 para la variante 18. También se muestra para las variantes 31, 33, 45, 52, 53 y 58 según se observa en la tabla 4 (1, 29-31).

Tabla 4: Iniciadores publicados para la detección de VPH por PCR.

Item	VPH	Iniciador F (Forward)	Iniciador R (Reverse)	Artículo publicado por:
1	16-E6	AGAATGTGTGTACTGCAAGCAACA	ATAAATCCCGAAAAGCAAAGTCAT	Bonifaz & Rocabado, 2020
2	16	CAGATCATCAAGAACACGTAGAGA	CCAGTGGACCATCTATTTTCAT	Bonifaz & Rocabado, 2020
3	16	TTGCAGATCATCAAGAACACGTAGAGA	GTAGAGATCAGTTGTCTCTGGTTGC	Fantin C. et al, 2023
4	16	GTCAAAAAGCCACTGTGTCTCT	CCATCCATTACATCCCGTAC	Vijayan A., 2022
5	16	GCACAAAAGAGAACTGCAATG	CTCTACGTGTCTTGATGATCTG	Kantún N. et al, 2023
6	16	CAGATCATCAAGAACACGTAGAG	GATTATGGTTTCTGAGAACAGAT	Kantún N. et al, 2023
7	16	CAAGTGTGACTCTACGTTCCGG	GATTATGGTTTCTGAGAACAGAT	Kantún N. et al, 2023
8	16	ATCTGTCTCAGAAACCATAATC	GTGGTGTGGCATATAGTGTG	Kantún N. et al, 2023
9	16	CAATGGGGAAGAGGGTACGG	CTCCTTTTTCAGCTCTACTTTG	Kantún N. et al, 2023
10	16	CTATATGCCAAACACCCTTAC	CTGTGATAATTCAAATGTACAATC	Kantún N. et al, 2023
11	16	GATTGTACATTTGAATTATCACAG	CCATAGAACTAAATTTCCATCC	Kantún N. et al, 2023
12	16	GGATGGAAATTTAGTTTCTATGG	GTCTATATGGTCACGTAGGTC	Kantún N. et al, 2023
13	16	GACCTACGTGACCATATAGAC	GTTACTGATGCTTCTCACAATA	Kantún N. et al, 2023
14	16	TATTTGTGAAGAAGCATCAGTAAC	TGGATAGTCGCTGTGTTTCTTC	Kantún N. et al, 2023
15	16	TATTTGTGAAGAAGCATCAGTAAC	GACGACACTGCAGTATAACAATG	Kantún N. et al, 2023
16	16	CATTGTATACTGCAGTGTCTGC	GTGGATGCAGTATCAAGATTTGT	Kantún N. et al, 2023
17	16	GAACCGAAACCGTTAGTATAA	ATGTATAGTTGTTTGCAGCTCTGT	Zapana E. et al, 2022
18	18	GTGAGAAACACACCACAATACT	CTCGTTGCAGCACGAATGG	Kantún N. et al, 2023
19	18	CCATTCGTGCTGCAACCGAG	GTTGCTTACTGCTGGGATGC	Kantún N. et al, 2023
20	18	ATTCGGTTGACCTTCTATGTC	GTCTGCTGAGCTTCTACTACT	Kantún N. et al, 2023
21	18	GCATCCAGCAGTAAGCAAC	CCGCCATGTTCCGCAATTTGT	Kantún N. et al, 2023
22	18	ACAAATGGCGAACATGGCGG	ACCACATTTGTAACGCAACAGG	Kantún N. et al, 2023
23	18	CCTGTTGCGTTACAAATGTGGT	CTCTATTTGTTGGTATCGCAGG	Kantún N. et al, 2023
24	18	CCTGCGATACCAACAATAGAG	GTATATTTGTGGTATAGTATTG	Kantún N. et al, 2023
25	18	CAATACTACTAACCACAATATAC	CAATCTCGGTTTTGTATGCAC	Kantún N. et al, 2023
26	18	GTGCATACAAAACCGAGGATTG	CTATATAAACGTGTTGTACCCT	Kantún N. et al, 2023
27	18	AGGGTACAACACGTTTTATATAG	GCTATGTTTTCGCAATCTGTACC	Kantún N. et al, 2023

Tabla 4: Iniciadores publicados para la detección de VPH por PCR. (continuación)

Item	VPH	Iniciador F (Forward)	Iniciador R (Reverse)	Artículo publicado por:
28	18	GGTACAGATTGCGAAAACATAGC	TTGGTACTACAGCATATGTATTAC	Kantún N. et al, 2023
29	18	CAGTGCCATTCGTGCTGCAA	GGAATTCATTTTGRGGCTCTAAA	Bonifaz & Rocabado, 2020
30	18	CAACCGAGCACGACAGGAACG	TAGAAGGTCAACCGGAATTTTCAT	Fantín C. et al, 2023
31	18	CCGAGCACGACAGGAACGCT	TCGTTTTCTTCCTCTGAGTCGCTT	Vijayan A K., 2022
32	18	GGACCGAAAACGGTGTATATAA	CAGTGAAGTGTTCAGTTCGGT	Zapana E. et al 2022
33	31	GAAATTGCATGAACTAAGCTCG	CACATATACCTTTGTTTGCAA	Fantín C. et al, 2023
34	33	ACTATACACAACATTGAACTA	GTTTTTACACGTCACAGTGCA	Fantín C. et al, 2023
35	45	GTGGAAAAGTGCAATACAGG	ACCTCTGTGCGTTCCAATGT	Fantín C. et al, 2023
36	52	TAAGGCTGCAGTGTGTGCAG	CTAATAGTTATTTCACTTAATGGT	Fantín C. et al, 2023
37	53	TTGTTCAAGTGTACGGGGCTAGC	GTGACGCCATTGCAGTTATCGCCT	Fantín C. et al, 2023
38	58	GTAAAGTGTGCTTACGATTGC	GTTGTTACAGGTTACACTTGT	Fantín C. et al, 2023
39	MY09/MY11	CGTCCMAARGGAWACTGATC	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG	Bonifaz & Rocabado, 2020
40	MY09/MY11	CGTCCMARRGGAWACTGATC	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG	Abdulsalam A. et al, 2023

Fuente: Falconi F. et al. 2023

Los iniciadores universales muy utilizados como MY09/MY11 incluidos en la Tabla 4, así como G5/G6 (no incluidos) son útiles en encontrar variantes intratipo de la región L1 del genoma viral del VPH, permite su uso para un amplio espectro de genotipos, como característica de este, se observa que el iniciador contiene secuencias degeneradas (32-35).

Además, se analizó las características de cada uno de los iniciadores, siendo útil en la decisión de selección de un par de estos y crear el programa correspondiente de PCR con los datos para el termociclador. Cada parámetro mostrado en la tabla 5 fue analizado con las herramientas bioinformáticas disponibles, en este caso la mayor parte fue realizado con MFEprimer, otros datos como los de la Tm y tamaño del amplicon fueron tomados de los publicados por los autores (Tabla 4).

Tabla 5: Parámetros analizados de los iniciadores para detección de VPH por PCR.

Item	Tamaño		Contenido GC (%)		ΔG (kcal/mol)		Base en el extremo 3'		Promedio Tm (°C)	Ampl pb
	F	R	F	R	F	R	F	R		
1	24	24	41.67	33.33	-25.04	-22.58	A	T	60	67
2	24	22	41.67	45.45	-23.25	-21.93	A	T	59	167
3	25	25	40.00	48.00	-25.08	-25.57	A	C	61	111
4	20	20	50.00	50.00	-21.31	-20.01	T	C	57	500
5	22	23	45.45	43.48	-22.80	-22.19	G	G	58	461
6	23	23	43.48	34.78	-22.19	-20.46	G	T	56	338
7	22	23	54.55	34.78	-24.23	-20.46	G	T	58	123
8	23	22	34.78	45.45	-20.46	-22.09	C	G	56	598

Tabla 5: *Parámetros analizados de los iniciadores para detección de VPH por PCR. (continuación)*

Item	Tamaño		Contenido GC (%)		ΔG (kcal/mol)		Base en el extremo 3'		Promedio	Ampl
	F	R	F	R	F	R	F	R	Tm (°C)	pb
9	20	23	60.00	43.48	-21.98	-22.81	G	G	60	354
10	22	24	40.91	29.17	-20.60	-20.13	C	C	54	524
11	24	23	29.17	34.78	-20.13	-19.93	G	C	53	589
12	23	21	34.78	47.62	-19.93	-20.22	G	C	54	424
13	21	24	47.62	33.33	-20.22	-21.67	C	A	56	365
14	24	23	33.33	43.48	-21.67	-22.79	C	C	57	303
15	24	22	33.33	45.45	-21.67	-22.06	C	G	57	537
16	22	23	45.45	39.13	-22.06	-22.15	C	T	58	191
17	22	24	40.91	37.50	-21.08	-23.42	A	T	58	128
18	22	20	40.91	60.00	-21.41	-23.62	T	G	60	455
19	20	20	60.00	55.00	-23.62	-22.09	G	C	61	395
20	22	22	45.45	45.45	-22.00	-21.79	C	T	58	183
21	20	20	55.00	55.00	-22.09	-23.37	C	T	61	491
22	20	22	55.00	45.45	-23.37	-23.26	G	G	62	423
23	22	22	45.45	45.45	-23.26	-21.72	T	G	59	526
24	22	24	45.45	29.17	-21.72	-19.20	G	G	54	371
25	24	22	29.17	45.45	-19.20	-22.46	C	C	55	488
26	22	23	45.45	34.78	-22.46	-20.40	G	T	57	258
27	23	23	34.78	43.48	-20.40	-23.09	G	C	57	430
28	23	24	43.48	33.33	-23.09	-20.84	C	C	57	211
29	20	24	55.00	37.50	-23.40	-22.80	A	A	61	142
30	21	24	61.90	37.50	-25.24	-23.08	G	T	62	172
31	20	24	65.00	45.83	-24.99	-25.52	T	T	64	200
32	22	21	41.00	48.00	-21.13	-21.99	A	T	50	124
33	22	22	40.91	31.82	-21.55	-19.36	G	A	55	263
34	21	21	28.57	42.86	-17.55	-21.69	A	A	54	398
35	20	20	45.00	50.00	-19.78	-22.01	G	T	58	151
36	20	24	55.00	25.00	-22.68	-18.77	G	T	56	229
37	22	24	54.55	54.17	-24.57	-27.94	C	T	65	549
38	21	21	42.86	38.10	-20.91	-19.68	C	T	55	274
39	20	20	50.00	45.00	-20.00	-19.22	C	G	55	450
40	20	20	50.00	50.00	-20.52	-20.66	C	G	57	450

Fuente: Falconi F. et al. 2023. La Tm va a depender de la concentración de sales y concentración del iniciador en uM

Algunos iniciadores tienen condiciones más convenientes que otros según se observa los valores en la tabla 5, la Tm corresponde al promedio calculado entre los dos iniciadores (F, R), todos los iniciadores no darían posibilidad a dimerización.

Conclusiones

- Para proceder a aplicar la técnica de PCR como medio de detección de algún determinado virus como es en este caso el VPH se requiere contar con un previo análisis de los iniciadores a utilizar, para asegurar buenos resultados. Este

trabajo muestra lo concerniente a realizar en el análisis y las secuencias de nucleótidos útiles para el diagnóstico de VPH para los tipos reconocidos como de alto riesgo 16 y 18 y algunos de bajo riesgo.

- Se incluye los parámetros determinados con las herramientas bioinformáticos, cuyos valores permiten tomar decisiones en la utilización de un par de iniciadores que cumpla con las características requeridas, teniendo 17 iniciadores para las variantes 16 y 15 para las variantes 18, además de 8 pares de iniciadores para otros tipos.
- Los criterios a elegir, puede ser reflexionada con los parámetros que se muestra de cada uno de los pares de iniciadores en la tabla 5, que permite tener fundamentos para decidir su selección.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses en relación con el artículo presentado.

Declaración de contribución de los autores

El artículo deberá acompañarse de una nota, que exprese la contribución de cada autor al estudio realizado.

Félix Atair Falconi Ontaneda análisis de iniciadores y redacción del artículo, José Andrés Zaporta Ramos revisión y correcciones del documento, Yisela Carolina Ramos Campi descarga de bibliografía, y revisión cumplimiento con las normativas de publicación, Gisnella María Cedeño Cajas revisión de normas bibliográficas

Referencias bibliográficas

1. Bonifaz D. Rocabado O. Identificación molecular de los VPH oncogénicos mediante PCR en tiempo real con sondas Taqman. Rev Cient Cienc Méd. 2020;23:122 - 8.
http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332020000200002
2. Toro A., Tapia L. Virus del papiloma humano (VPH) y cáncer. Medicina y Laboratorio. 2021;25(2):467-83.
<https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/431>
3. Hesselberg A. Stosic M. Marc J. Kraus I. Vangstein H. Herman O. Rounge T. TaME-seq2: tagmentation-assisted multiplex PCR enrichment sequencing for viral genomic profiling. Virol J. 2023;20(1):44.

4. Hott K. Ramírez E. Ortega M. Santander E. Fernández J. Zemelman V. Correa C. Prevalencia y genotipificación de virus papiloma humano vaginal y cervical en trabajadoras sexuales de un centro de salud sexual en la zona Norte de Santiago, Chile. *Rev Chilena Infectol.* 2022;39:117-25.
https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182022000200117
5. Abdulsalam A. Abdalla A. Salim I. Genotyping and Phylogenetic Analysis of Human Papillomaviruses in Formalin Fixed Paraffin Embedded Sections from Cervical Lesions in Duhok-Iraq. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2023;24(4):1313-9.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37116154/>
6. Mendoza L., Urdaneta J., Silva C., Maggiolo I., Baabel N., Mejía R. Virus de papiloma humano y lesión intraepitelial cervical en adolescentes embarazadas. *Revista Digital de Postgrado.* 2021;11(1).
<http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/101/1012349003/1012349003.pdf>
7. Guerra F. Rocher A. Angeleri A. Díaz L. Mendeluk G. Quintana S. Palaoro L. Moléculas de adhesión y proteínas oncogénicas de virus de papiloma humano en la progresión de cáncer de cuello uterino. *Bioquímica y Patología Clínica.* 2018;82(2):30-5. <https://www.revistabypc.org.ar/index.php/bypc/article/view/86>
8. Santos G. Marquez L. Reyes J. Vallejo V. Aspectos generales de la estructura, la clasificación y la replicación del virus del papiloma humano. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2015;53(2):66-71. <https://www.medigraphic.com/pdfs/imss/im-2015/ims152h.pdf>
9. di Filippo G., Orjuela J., Osorio W., Jiménez L. Detección de ARNm de oncoproteínas E6/E7 del Virus del Papiloma Humano en cáncer de cuello uterino. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana.* 2019;52(3):361-72.
<http://www.scielo.org.ar/pdf/abcl/v52n3/v52n3a12.pdf>
10. Markovic I., Hosnjak L., Seme K., Poljak M. Molecular Characterization of Human Papillomavirus Type 159 (HPV159). *Viruses.* 2021;13(8).
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8402796>
11. Aldana A. Nuevas técnicas de diag mol en lesiones plantares por VPH TDUEX.pdf>: Universidad de Extremadura; 2023.
https://dehesa.unex.es:8443/bitstream/10662/17502/6/TDUEX_2023_Aldana_Caballero.pdf
12. Zhang J., Cheng K., Wang Z. Prevalence and distribution of human papillomavirus genotypes in cervical intraepithelial neoplasia in China: a meta-

- analysis. Arch Gynecol Obstet. 2020;302(6):1329-37.
https://eurekamag.com/research/036/634/036634923.php?gclid=Cj0KCQjwqP2pBhDMARIsAJQ0CzqFTEHLA3FW-ey1gO28etDCsFypEO9FfByXJAGYkZorc0m2-CeW64waAo5rEALw_wcB
13. Ramos Ramirez MC, Tinajero Vasconez MF, Carrero Castillo YN, Falcón Córdova D. Virus del Papiloma Humano como factor etiopatogénico de lesiones cervicales: Revisión de literatura. Enfermería Investiga: Investigación, Vinculación, Docencia y Gestión. 2018;3(4, Dic):208-14.
<https://revistas.uta.edu.ec/erevista/index.php/enfi/article/view/388>
 14. Ramirez-Pineda AT, González MI, Castañeda-Vanegas KM, Agudelo-Fernández MC, López-Urán C, Sánchez-Vásquez GI. Filogenia y oncogénesis del virus del papiloma humano: una aproximación translacional al descubrimiento de biomarcadores para la detección de lesiones precancerosas de cérvix. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. 2019;43(168):351-65. <http://www.scielo.org.co/pdf/racefn/v43n168/0370-3908-racefn-43-168-351.pdf>
 15. Paz B. Virus de Papiloma Humano. Revisión de la evidencia. Datos para España y Galicia. In: Compostela UdSd, editor. España2020. p. 36.
https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/24803/2020_TFG_Medicina_Paz_Virus.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 16. Massely M, Iglesias S, Aguilar F. Detección de oncoproteínas E6/E7: una alternativa para el tamizaje de cáncer de cérvix. Rev Exp Med. 2018;4(3):4.
<https://rem.hrlamb.gob.pe/index.php/REM/article/view/245>
 17. Totaro M. Análisis de los Genes E6, E7 y L1 del virus Papiloma Humano tipo 16 como marcadores pronóstico tempranos de la progresión de lesiones de Cuello Uterino: Universidad Nacional de Misiones; 2022.
<https://rid.unam.edu.ar/handle/20.500.12219/3824>
 18. Chouhy D., Bolatti E., Perez G., Giri A. Analysis of the genetic diversity and phylogenetic relationships of putative human papillomavirus types. J Gen Virol. 2013;94(Pt 11):2480-8. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23997181>
 19. Medina M., Medina M., Merino L. Valoración diagnóstica de técnicas moleculares para detección de infección bucal por virus del papiloma humano. Rev Costarr Salud Pública. 2012;21(2):116-22.
https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-14292012000200013

20. Diz O. Técnicas de biología molecular en el diagnóstico de enfermedades infecciosas. *Revista para profesionales de la salud*. 2020;3(30):88-111. <https://www.npunto.es/revista/30/tecnicas-de-biologia-molecular-en-el-diagnostico-de-enfermedades-infecciosas>
21. Mesa J., Tapia L., Loaiza N., Echeverry J., Toro A. Detección y genotipificación del virus del papiloma humano de alto riesgo mediante PCR multiplex en tiempo real (RT-PCR VPH AR). *ABC del laboratorio*. 2021;25. <https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/439>
22. Romero D., Cárdenas O., Álvarez M. Diseño y evaluación de primers in silico del gen E1 del virus de chikungunya para Real-Time PCR (qPCR). *Revista con-Ciencia*. 2018;6(1):07-124. <https://revmedicaelectronica.sld.cu/index.php/rme/rt/printerFriendly/1124/html>
23. Hernández C., Valdez R. Análisis de iniciadores con herramientas bioinformáticas libres en línea. *Temas de Ciencia y Tecnología*. 2017;22(64):5 - 19.
24. Riveroll F. Diseño de primers para PCR 2022 [Available from: <https://friveroll.github.io/posts/dise%C3%B1o-de-primers-para-pcr/>].
25. Peter M., Butler J. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques*. 2004;37(2). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15335214>
26. Guevara K. Diseño y validación in silico de primers para la amplificación del Gen GSTM1. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato; 2022.
27. Riaño D. Diseño de oligonucleotidos iniciadores 2023 [cited 2023. Available from: <http://bioinf.ibun.unal.edu.co/documentos/primers/primer.php#PCR%20o%20para%20Secuenciaci>].
28. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B. C., Remm M., et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res*. 2012;40(15):e115.
29. Kantun N. Ayora G. Gonzalez M. Gomez J. Conde L. Design of a data set of qPCR primers for the early region of Human Papillomavirus oncogenic types 16 and 18. *Data Brief*. 2023;47:109015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22730293/>
30. Fantin C., Freitas J. B., Teles H. F. M., Oliveira B. A. S., Brito D. V. High prevalence of HPV 18 and multiple infections with oncogenic HPV genotypes in

- women at risk of cervical cancer examined in Manaus, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2023;56:e12720. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37255098/>
31. Vijayan A. K. Muthukrishnan A. Velayudhannair V. Varun J. Vidyadharan M. James J. Expression of human papillomavirus 16 and 18 DNA in oral lichen planus using polymerase chain reaction. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2022;26(4):495-500. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10112116/>
 32. Falcón d. Situación actual del virus del papiloma humano (VPH) de alto y bajo riesgo asociado a lesiones cervicales en mujeres del Ecuador. Ecuador: Universidad Técnica de Ambato; 2019. <https://produccioncientificaluz.org/index.php/kamera/article/view/33050>
 33. Peña B. Estandarización de una qPCR multiplex del oncogén E7 para genotipificación de Virus del Papiloma Humano de alto riesgo Colombia: Universidad Industrial de Santander 2021. <https://revistas.uis.edu.co/index.php/revistasaluduis/article/view/12502>
 34. Castello J. <Tese_João_Paulo_Vidal Estudo dos genótipos de HPV presentes em tumores do colo do útero.pdf>. Brasil: Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer; 2016. <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-943278>
 35. Cruz J. ML, Quintero M., Bastidas M., Puig J.,. Estudio de variantes intra-tipo del virus del papiloma humano tipo 16, por análisis nucleotídico de la región MY09-MY11. *Rev Obstet Ginecol Venez* 2013 73(3):187-94. <https://ve.scielo.org/pdf/og/v73n3/art06.pdf>

El artículo que se publica es de exclusiva responsabilidad de los autores y no necesariamente reflejan el pensamiento de la **Revista Anatomía Digital**.



El artículo queda en propiedad de la revista y, por tanto, su publicación parcial y/o total en otro medio tiene que ser autorizado por el director de la **Revista Anatomía Digital**.



Indexaciones

