



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias de la Vida

Diseño de una matriz basada en el modelo de analisis RIDIT para la evaluación in-silico de iniciadores usados en el estudio de filogenia molecular de Virus del Papiloma Humano HPV-16, 18 y 58.

INFORME DE PROYECTO INTEGRADOR

Previa a la obtención del Título de:

Biólogo

MIGUEL DAVID ROJAS CARRIÓN

GUAYAQUIL – ECUADOR

AÑO: 2017

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento va dirigido hacia las personas que aportaron con un granito de su vida para que se haga posible la culminación de mi vida universitaria. A Dios por darme la sabiduría necesaria para asumir correctamente mis responsabilidades, a Edith Carrión mi madre, Angélica, Diego, Israel, Daniela y Paola mis hermanos, por el apoyo incondicional que siempre mostraron hacia mí y por ser el motor que empuja el cumplir de mis anhelos, a Cesar Bedoya y Heydi Roa quienes creyeron en mí y me dieron la oportunidad de desarrollar el tema, a Franco Rojas y Rosario Carrión quienes me aportaron con un techo, compañía y su experiencia, a Joshua Perelli y Cecilia Cabrera que fueron pilar fundamental en la parte emocional durante mi transitar universitario, a todos mis compañeros de clase que durante el compartir diario se lograron convertir en mi familia politécnica, aprecio mucho su amistad y su ayuda por eso les quedare agradecido por siempre.

DEDICATORIA

Mi dedicatoria va dirigida a Edith Carrión mi madre, por ser una persona que siempre lucha por cumplir sus anhelos y apoya incondicionalmente a su familia, sin importar las adversidades que se presentan en el camino, a Daniela Rojas mi hermana, por ser una mujer que lucha de forma sobrenatural para levantarse de los golpes que le da la vida y por poseer el alma más fuerte que he conocido. Así mismo, quiero dedicar este trabajo a las personas que se encuentran en la lucha contra el cáncer y en especial a quienes lucharon con todo el poder de su alma, pero perdieron la batalla, hacerles saber que daré todo mi esfuerzo en hacer lo posible para que el cáncer no siga dejando personas en luto.

EVALUADOR DEL PROYECTO

M.Sc. Cesar Bedoya

Tutor Proyecto Integrador

M.Sc. Diego Gallardo

Profesor Materia Integradora

M.Sc. Heydi Roa

Co-Tutor Proyecto Integrador

DECLARACIÓN EXPRESA

"La responsabilidad y la autoría del contenido de este Trabajo de Titulación, me corresponde exclusivamente; y doy mi consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual"

.....
Miguel Rojas-Carrión.

RESUMEN

En el 2012 a nivel mundial se reportaron 265 672 muertes por cáncer de cérvix, la incidencia y mortalidad se encuentran en incremento debido a que aproximadamente 570 000 mujeres poseen una infección con algún tipo de Papiloma virus Humano cada año. Es necesario que los países empiecen a implementar y adoptar medidas de acción que reduzcan la incidencia y mortalidad de cáncer de cérvix, entre ellas, se necesita desarrollar estrategias de diagnóstico efectivo basadas en técnicas moleculares. En los laboratorios existe la problemática general, donde, la evaluación de los iniciadores a usar nace de forma empírica, subjetiva y sin fundamentos estadístico que corroboren la eficiencia de estos, teniendo que someter a los iniciadores a diferentes pruebas de laboratorio, generando pérdida de tiempo y dinero que pueden ser usados directamente en la investigación. En este estudio se usó la técnica de análisis Redit para generar valores cuantitativos a respuestas con orden categórico y el Análisis de Componentes Principales para generar una reducción de variables y obtener el score que ayuda a generar el peso a cada variable analizada en la evaluación de iniciadores. Basados en la matriz de evaluación con puntuaciones Redit se logra desarrollar un modelo matemático que mide la calidad de los iniciadores. Usando el modelo desarrollado se reporta que para HPV16 el 26% de los iniciadores tienen alta efectividad, para HPV58 el 32% de los iniciadores son eficientes y para HPV18 únicamente el 31% de los iniciadores son efectivos. El modelo tiene que ser probada en laboratorio para obtener la maduración final que prediga que iniciador es efectivo y así se logra contribuir a tener un diagnóstico temprano.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS	2
DEDICATORIA	3
EVALUADOR DEL PROYECTO	4
DECLARACIÓN EXPRESA	5
RESUMEN	6
ÍNDICE GENERAL	7
ABREVIATURA	10
ÍNDICE DE FIGURA	11
ÍNDICE DE TABLAS	12
ÍNDICE DE ANEXOS	13
INTRODUCCIÓN	14
CAPÍTULO 1	15
1.1. Epidemiología de cáncer de cérvix.	16
1.2. Papillomaviridae	19
1.2.1. Estructura genética de Papilomavirus.....	20
1.2.2. Ciclo de vida infeccioso de Papilomavirus.....	21
1.3. Prevalencia de HPV de alto riesgo a nivel mundial y en Ecuador.	22
1.4. Diagnóstico de HPVs.	23
CAPÍTULO 2	26
2.1. Evaluación de Iniciadores	26
2.1.1. Selección bibliográfica de iniciadores.	26
2.1.2. Parámetros y criterios de evaluación.....	26
2.1.2.1. Longitud del iniciador y diferencia de longitudes entre el par de iniciadores.	27
2.1.2.2. Contenido de GC.....	27
2.1.2.3. Temperatura Melting (Tm) y diferencia de Tm entre el par de iniciadores.....	27
2.1.2.4. Formación de Dímeros.....	27

2.1.2.5.	Formación de horquilla.....	27
2.1.3.	Análisis de los parámetros usando la herramienta OligoCalc.....	28
2.1.3.1.	Temperatura de melting (Tm).....	28
2.1.3.2.	Formación de Dímeros y horquilla.....	29
2.1.3.1.	Especificidad.	32
2.1.4.	Análisis de los parámetros de especificidad usando BLAST.....	32
2.2.	Análisis Ridit.....	33
2.2.1.	Scoring Ridit en variables categóricas.....	33
2.2.2.	Scoring Ridit según Bross.	35
2.2.3.	Justificación heurística del traslado de Ridit de Bross al Ridit de variables paramétricas.	35
2.3.	Análisis de Componentes Principales.....	36
2.3.1.	Análisis de varianza.	37
2.4.	Poder Discriminatorio de las variables.....	¡Error! Marcador no definido.
CAPÍTULO 3	38
3.1.	Datos obtenidos del cálculo de scoring Ridit.	38
3.2.	Datos obtenidos en la matriz de respuestas categóricas originales.	39
3.3.	Análisis de Componentes Principales.....	41
CAPÍTULO 4	47
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		47
BIBLIOGRAFÍA.....		49
ANEXOS.....		57
Anexo A.	Árbol filogenético para 189 PVs	57
Anexo B.	Tabla de clasificación de Papilomavirus.....	58
Anexo C.	Tabla de Iniciadores para HPV16	62
Anexo D.	Tabla de iniciadores para HPV18	65
Anexo E.	Tabla de Iniciadores para HPV58	68

Anexo F.	Score subjetivo concedido a Iniciadores de HPV16, 18 y 58	75
Anexo G.	Score Redit para cada iniciador.	85
Anexo H.	Matriz de Correlaciones ^{a*b}	95

ABREVIATURA

PV: Papilomavirus

HPV: Human Papillomavirus

Pb: Pares de bases.

ORF: Open Reading Frame

IARC: International Agency for Research on Cancer.

GCO: Global Cancer Observatory

Nt: nucleótidos

GC: Guanina y Citosina

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

NCBI: National Center for Biotechnology Information.

ACP: Análisis de Componentes Principales.

ÍNDICE DE FIGURA

Figura 1.1.	Tasas estandarizadas de edades a nivel mundial de casos de cancer en mujeres en el 2012 atribuidos a infección por Papilomavirus Humano (HPV), por pais.	16
Figura 1.2.	Casos de cáncer para mujeres en el 2012 atribuidos a infección, a nivel mundial, indicando por agentes infecciosos.	17
Figura 1.3.	Número estimado de muertes, cáncer de cérvix, a nivel mundial 2012.	17
Figura 1.4.	Número de muertes estimadas, Ecuador top 10 de tipos de cáncer en 2012. .	18
Figura 1.5.	Número de muertes reportadas en Ecuador para el 2012 y estimación de nuevos reportes para el 2020.	18
Figura 1.6.	Frecuencia de distribución de HPV.	19
Figura 1.7.	Estructura de Papillomavirus y genoma completo.	20
Figura 1.8.	Ciclo infeccioso de Papilomavirus.	21
Figura 3.1.	Gráfico de sedimentación de las componentes principales.	43
Figura 3.2.	Representación de Score en la recta real.	44
Figura 3.3.	Distribución de los iniciadores usados en el estudio.	45
Figura 3.4.	Evaluación de iniciadores usados en la filogenia molecular de HPV16.	45
Figura 3.5.	Evaluación de iniciadores usados en la filogenia molecular de HPV58.	46
Figura 3.6.	Evaluación de iniciadores usados en la filogenia molecular de HPV18.	46
Figura 5.1.	Árbol filogenético de la secuencia L1 para 189 PVs.	57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Técnicas clínicas y moleculares para diagnóstico de HPV.	24
Tabla 2.	Parámetros con sus respectivos criterios de evaluación para cada par de iniciadores encontrados en la bibliografía.	30
Tabla 3.	Parámetros con su respectivo criterio de evaluación para la especificidad de los iniciadores.	32
Tabla 4.	Tabla de Frecuencias para Posibilidad de Dimerización (nt)	34
Tabla 5.	Calculo Redit para el parámetro Posibilidad de Dimerización.....	35
Tabla 6.	Puntuaciones Redit para los parámetros en estudio.	38
Tabla 7.	Matriz con respuestas categóricas Originales	39
Tabla 8.	Matriz de datos con valores Redit.....	40
Tabla 9.	Matriz Ortogonal.....	41
Tabla 10.	Varianza Total Explicada	42
Tabla 11.	Matriz de Componentes Principales.	43
Tabla 12.	Clasificación taxonómica de Papillomavirus, género y especies.....	58
Tabla 13.	Iniciadores seleccionados para filogenia molecular de HPV16.....	62
Tabla 14.	Iniciadores seleccionados para filogenia molecular de HPV18.....	65
Tabla 15.	Iniciadores seleccionados para filogenia molecular de HPV18.....	68
Tabla 16.	Tabla de correlaciones entre las nuevas variables	95

NDICE DE ANEXOS

Anexo A.	Árbol filogenético para 189 PVs	57
Anexo B.	Tabla de clasificación de Papilomavirus.....	58
Anexo C.	Tabla de Iniciadores para HPV16.....	62
Anexo D.	Tabla de iniciadores para HPV18.....	65
Anexo E.	Tabla de Iniciadores para HPV58.....	68
Anexo F.	Score subjetivo concedido a Iniciadores de HPV16, 18 y 58.....	75
Anexo G.	Score Ridit para cada iniciador.....	85
Anexo H.	Matriz de Correlaciones ^{a*b}	95

INTRODUCCIÓN

La incidencia y mortalidad de cáncer ha venido incrementado rápidamente a nivel mundial, en especial en países de bajo y medio desarrollo, según la International Agency for Research on Cancer (IARC) para el 2012 a nivel mundial se reportaron 265 672 muertes en mujeres por cáncer de cérvix, Asia presenta la mayor tasa y América Latina se encuentra en tercer lugar. En Ecuador se registra al cáncer cervical como la primera causa de muerte de mujeres con 1 026 casos reportados para el 2012, incluso por encima del cáncer de estómago, para el 2015 se registran 1 170 casos y mediante modelamientos se estiman que para el 2020 se registrarán un total de 1 380 casos, se ve que el índice de mortalidad por cáncer de cérvix se encuentra en aumento.

Según datos obtenidos por Global Cancer Observatory de la IARC, a nivel mundial el agente que predomina en los tipos de cáncer en mujeres es el virus del Papiloma Humano (HPV) con total de 570 000 casos, igualmente en América Latina se reporta a HPV como el principal agente causante de cáncer de cérvix, con un total de 48 000 casos reportados para el 2012.

Es necesario que todos los países empiecen a implementar y adoptar medidas de acción para el control del cáncer, cabe recalcar que desde 1980 América latina fortaleció el sistema de salud tratando de reducir las desigualdades en los sectores de salud (Atun et al., 2015), sin embargo, con el enfoque de análisis de cobertura universal se observa que las desigualdades aún existen (Atun et al., 2015; Forman & Sierra, 2016; Magnusson et al., 2014). Para el 2013 países de Sur América y el Caribe empezaron a desarrollar políticas operacionales, estrategias y planes de acción específicos para el control de cáncer, sin embargo, solamente Argentina, Chile, Cuba y Nicaragua han implementado completamente las estrategias (Forman & Sierra, 2016). Ecuador actualmente se encuentra desarrollando políticas operacionales, estrategias y planes de acción para el control de los factores de riesgo del cáncer, en el 2011 se implementa el control del consumo de tabaco, para el 2013 se regula el consumo de alcohol y aún no hay datos que muestren que se ha trabajado en el sobrepeso, actividades físicas y cuidado en la dieta.

Para reducir el índice de mortalidad causado por cáncer de cérvix en Ecuador, es de vital importancia generar educación sexual a todos los niveles educacionales y etarios, así mismo, implementar el diagnóstico molecular oportuno y efectivo que ayudan a tener un cribado y poder tratar a tiempo las pacientes con dicha patología. Así mismo es necesario incrementar las áreas de biología molecular que se encarguen a la Salud Pública.

Para el desarrollo efectivo de técnicas moleculares se necesita crear iniciadores o usar iniciadores que han sido creados por otros investigadores, en muchas ocasiones los iniciadores creados no son evaluados hasta que llegan al laboratorio y se someten a pruebas, lo que causa pérdida de tiempo. Actualmente existen formas de evaluar in-silico a los iniciadores, dándoles un criterio de forma empírica y sin fundamento científico, por lo cual en este estudio definimos los siguientes objetivos: (i) Desarrollar un modelo que mida calidad, basado en la matriz de score que determine el peso de cada variable usada en la evaluación de iniciadores. (ii) Evaluar in-silico iniciadores empleados en la filogenia molecular del virus del Papiloma Humano HPV16, 18 y 58 usando las herramientas OligoCalc y Blast y (iii) Diseñar una matriz de score por medio de Análisis Rídit y Análisis de Componentes Principales.

CAPÍTULO 1

INFORMACIÓN GENERAL

1.1. Epidemiología de cáncer de cérvix.

La incidencia de cáncer de cérvix se ve disperso a nivel mundial, y se encuentra en incremento, en especial en los países de bajo y medio desarrollo, en el figura1.1 se puede observar que América Latina y el Caribe tienen una alta tasa de mortalidad causado por el cáncer de cérvix, además, se puede observar que Ecuador posee un alto índice de mortalidad atribuido a infección por HPV según datos obtenidos en el 2012 por la Internacional Agency for Research on Cancer (IARC).

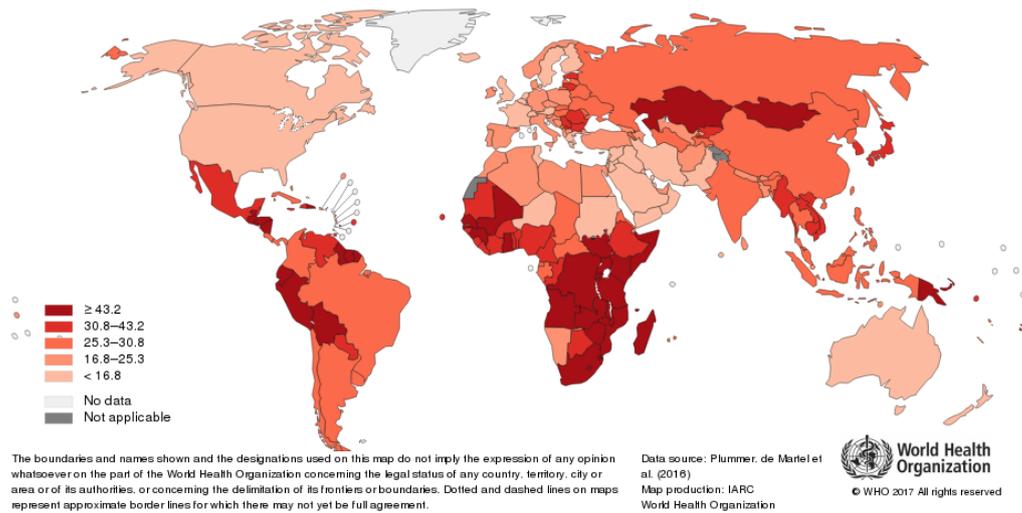
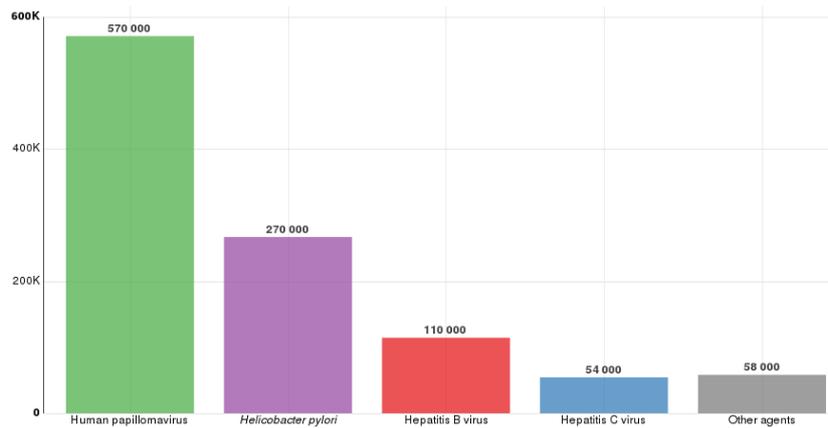


Figura 1.1. Tasas estandarizadas de edades a nivel mundial de casos de cancer en mujeres en el 2012 atribuidos a infección por Papilomavirus Humano (HPV), por país.

Fuente: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization & Plummer, de Marle (2016).

A nivel mundial se registra al virus del Papiloma Humano (HPV) como el principal agente de infección asociado al cáncer de cérvix, se observar en la figura1.2 que incluso se encuentra por encima de *Helicobacter pylori* agente causante del cáncer de estómago.



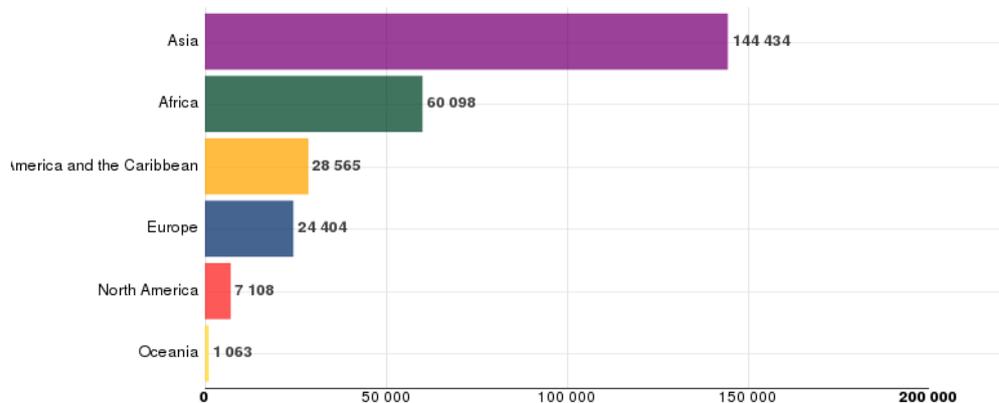
Data source: Plummer, de Martel et al. (2016)
 Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)
 © International Agency for Research on Cancer 2017



Figura 1.2. Casos de cáncer para mujeres en el 2012 atribuidos a infección, a nivel mundial, indicando por agentes infecciosos.

Fuente: Global Cancer Observatory, International Agency for Research on Cancer & Plummer, de Marle (2016).

Se puede observar en la figura 1.3. que para el 2012 Asia alcanzó el mayor índice de mortalidad, mientras que América Latina y el Caribe se encuentran en el tercer lugar.



Data source: GLOBOCAN 2012
 Graph production: Global Cancer Observatory (<http://gco.iarc.fr/>)
 © International Agency for Research on Cancer 2017



Figura 1.3. Número estimado de muertes, cáncer de cérvix, a nivel mundial 2012.

Fuente: GLOBOCAN 2012, Global Cancer Observatory & International Agency for Research on Cancer (2017).

Para Ecuador se registra al cáncer de cérvix como el predominante en todos los tipos de cáncer con un total de 1 026 casos reportados para el 2012 figura 1.4., mediante modelamientos se estima que para el 2020 se pueden llegar a reportar 1 380 casos

figura1.5, evidenciando que si no se toman medidas preventivas se tiende a un aumento en el índice de mortalidad por cáncer de cérvix.

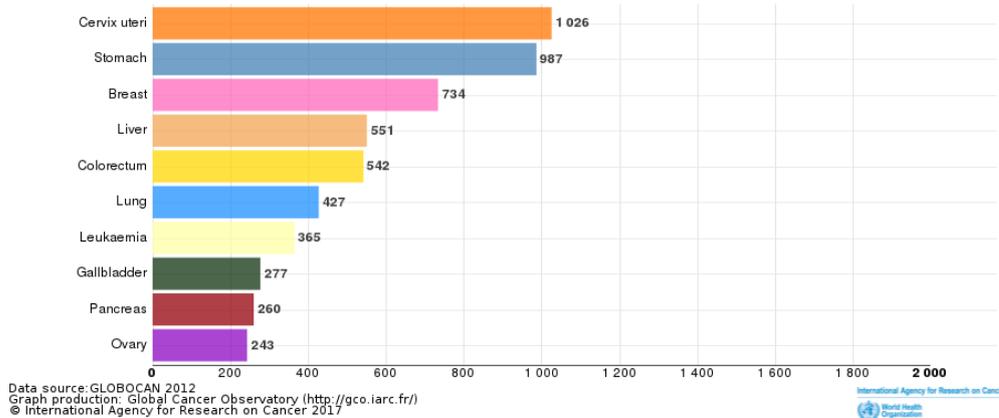


Figura 1.4. Número de muertes estimadas, Ecuador top 10 de tipos de cáncer en 2012.

Fuente: GLOBOCAN 2012, Global Cancer Observatory & International Agency for Research on Cancer (2017).

International Agency for Research on Cancer
 Ecuador
 Cervix uteri
 Number of cancer deaths in 2020 (all ages)

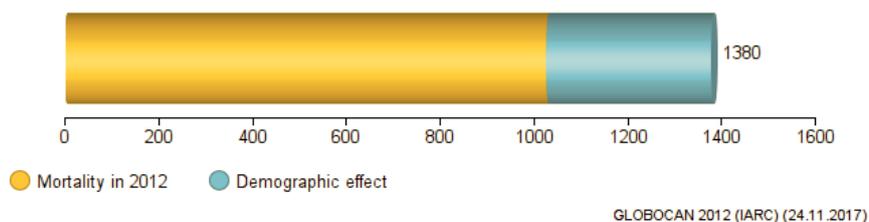


Figura 1.5. Número de muertes reportadas en Ecuador para el 2012 y estimación de nuevos reportes para el 2020.

Fuente: GLOBOCAN 2012, Global Cancer Observatory & International Agency for Research on Cancer (2017).

Para poder romper las desigualdades en los sistemas de salud a nivel global y tener mayor control sobre los índices de muertes por cáncer de cérvix se presentan los desafíos a cumplir: (i) tener más organización encargadas en sistemas de salud, (ii) acabar con la desigualdad en sistemas de financiamiento para todos los sectores sociales, (iii) desarrollar sistemas de salud que cumplan con las necesidades emergentes con respecto a transiciones y transmisión demográfica de enfermedades,

(iv) obtener una planificación para el crecimiento urbano acelerado, (v) garantizar sostenibilidad de las inversiones necesarias para mantener una igualdad de cobertura universal (Forman & Sierra, 2016). Se requiere que se implementen políticas y servicios efectivos para prevención del cáncer, así mismo, incrementar el acceso a: diagnóstico, cribado (screening), tratamiento, cuidados paliativos, y una reducción drástica del uso de tabaco y alcohol (Magnusson et al., 2014) ya que son considerados como factores de riesgo que se pueden controlar y así disminuir el índice de desarrollo del cáncer.

1.2. Papillomaviridae

Papillomavirus (PVs) corresponde a un grupo grande y diverso de virus considerados dentro de la familia Papillomaviridae, cuyas características los definen como pequeños viriones de 50-55 nm de diámetro, estructura con simetría icosaédrica, sin envoltura y doble cadena de DNA circular de aproximadamente 8kb de tamaño y contiene ocho genes (Doorbar et al., 2012; de Villiers, Fauquet, Broker, & Bernard, 2004). Actualmente se estima que hay 202 tipos de PVs pertenecientes a 49 especies englobadas en cinco géneros (Bzhalava, Eklund, & Dillner, 2015) y más de 100 tipos pueden infectar a los humanos, el virus del Papiloma tienen un estrecho rango de hospedadores y muchos tipos pueden infectar a un solo hospedador (Doorbar et al., 2012). La clasificación sigue un criterio filogenético establecido por la International Human Papillomavirus (HPV) Reference Center, (2017) con niveles taxonómicos de: familia, género, especie, tipo, subtipo y variante figura 1.6.

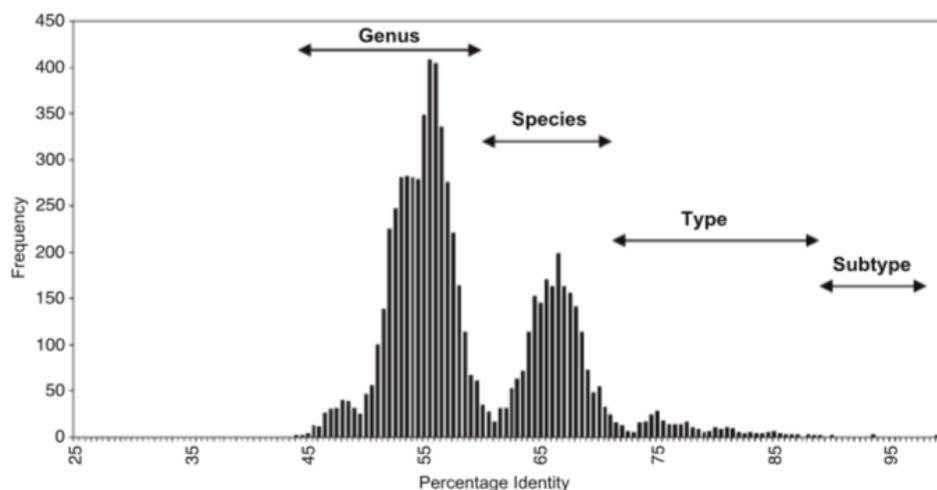


Figura 1.6. Frecuencia de distribución de HPV.

Frecuencias de porcentajes de identidad de secuencias de nucleótidos en comparación de la región L1 ORFs de 118 tipos de papilomas.

Fuente adaptada (de Villiers et al., 2004).

1.2.1. Estructura genética de Papilomavirus

Los virus del Papiloma tienen la organización genómica similar entre ellos, poseen entre 7 y 10 Regiones de lectura abierta (ORFs por sus siglas en inglés), los ORFs son clasificados con (E) de Early y con (L) de Late, con base en su localización en el genoma **figura 1.7.** y de acuerdo con su expresión durante el ciclo de vida del virus. La región E1 codifica proteínas que tienen acción helicasa, controlan la transcripción y replicación viral, la región E2 es considerada como un factor de transcripción viral, la región E4 está relacionada con la producción de proteínas que interactúan con el citoesqueleto celular para el correcto ensamblaje del virus, la región E5 codifica proteínas que interactúan con receptores de factores de crecimiento, la región E6 codifica proteínas que tienen como acción la degradación de p53, tienen acción telomerasa, induce a la inestabilidad genética del huésped y tiene interacciones con los dominios proteicos PDZ, la región E7 se encuentra relacionada con la degradación pRb y la inestabilidad genética del huésped, la región L1 codifica la proteína mayor de la cápside viral, la región L2 codifica para la proteína menor cápside viral y es la encargada de la reclusión del genoma viral para su debida organización en la cápside (Grillo-Ardila, Martínez-Velásquez, & Morales-López, 2008).

Una región de 1000pb denominada Región Larga de Control (LCR por sus siglas en inglés) se encuentra localizada entre L1 y E6/E7 ORFs figura 1.7, dicha región contiene el origen de la replicación y los elementos de transcripción regulados para la expresión del genoma viral (Chemes, Sánchez, Alonso, & de Prat-Gay, 2011).

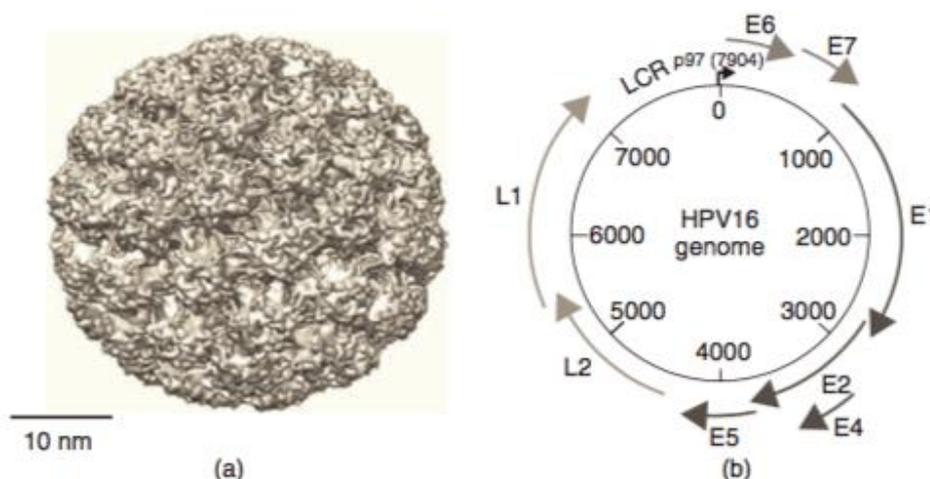


Figura 1.7. Estructura de Papilomavirus y genoma completo.

(a) Estructura de la cápside de Papilomavirus, basada sobre reconstrucción cryo-EM de partículas de Papilomavirus bobino. (b) Genoma de HPV16 mostrando la localización de ORFs tempranos (E) y tardíos (L) y la región de control (LCR) que contiene el promotor de la proteína p97. Fuente Adaptada de (Chemes et al., 2011)

El gen L1 es usado para la clasificación y construcción de árboles filogenéticos, puede ser alineada con los PVs conocidos (Bernard, Burk, Chen, Doorslaer, & Villiers, 2010). Usando la región L1 y basándose en los estudios de Bzhalava et al., (2015); Bernard et al., (2010) y de Villiers et al., (2004) se logra identificar grupos de PVs como se observa en el **anexo1** y **anexo2**, los tipos de PVs encontrados en humanos han sido divididos en cinco géneros, Alpha, Beta, Gamma, Mu y Nu.(Schiffman et al., 2016).

1.2.2. Ciclo de vida infeccioso de Papilomavirus

El virus del papiloma ha co-evolucionado con su hospedador, desarrollando preferencia hacia células o regiones anatómicas específicas del huésped (McBride, 2017), en la mayoría de interacciones se han desarrollado adaptaciones con resultados oncogénicos (Schiffman et al., 2016).

En el epitelio estratificado, las células se encuentran unidas a la membrana basal, lugar donde se dividen formando las nuevas células, las mismas que se mueven por medio del epitelio y van adquiriendo características de diferenciación, el movimiento lo hacen hasta la superficie del epitelio estratificado y son las encargadas de eliminar las células dañadas que se encuentran en la parte superficial del tejido y forman parte del proceso de regeneración del tejido, HPV ha evolucionado de tal forma que usa la técnica de regeneración de tejido para poder infectar al huésped (Stanley, 2012).

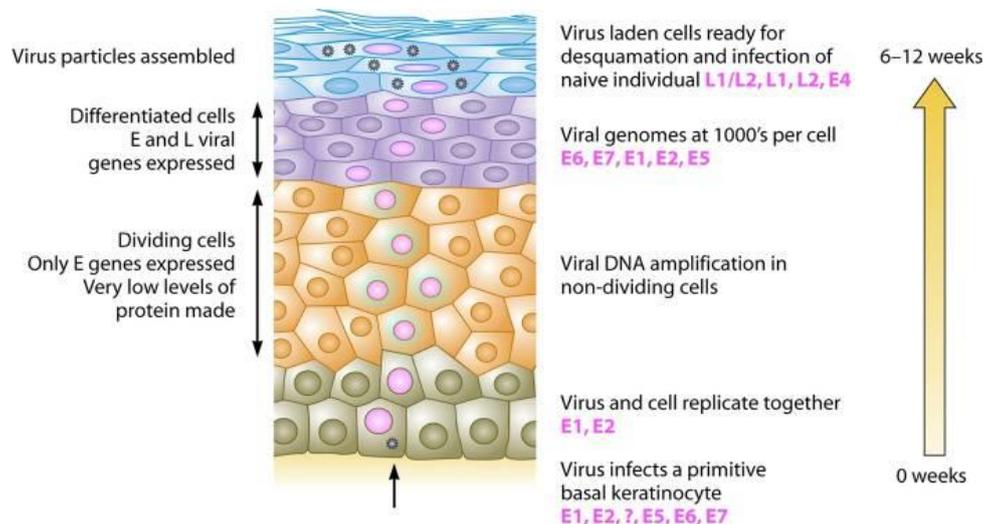


Figura 1.8. Ciclo infeccioso de Papilomavirus.

Se muestra las diferentes capas del epitelio estratificado con las etapas de infección.

Fuente: (Stanley, 2012)

Papilomavirus entra a las células basales por una fisura en el epitelio, en la figura 1.8 se indica con una flecha negra la entrada del virus, una vez dentro el virus se mueve por

medio del endosoma y se establece como una infección persistente de bajo nivel (McBride, 2017), con una transcripción viral no significativa, el virus se encuentra descubierto pero el genoma viral espera hasta que la membrana nuclear de la célula se rompa durante la mitosis y así lograr entrar al núcleo de la célula, dentro del núcleo el genoma viral tiene una limitada amplificación y se estabiliza uniéndose a la cromatina, seguidamente cuando las células basales infectadas se encuentran diferenciadas, es decir, en la parte superficial del epitelio, se producen altos niveles de expresión génica viral y síntesis de DNA viral, estrategia que ayuda al virus a evitar el sistema inmune, ya que, la expresión viral ocurre únicamente en células terminalmente diferenciadas (Schiffman et al., 2016; Stanley, 2012), y en la etapa final se empaquetan las partículas víricas nuevas y los viriones se desprenden por descamación del epitelio, se indican en la figura 1.8 las diferentes proteínas que son empleadas en las diferentes etapas del proceso (McBride, 2017).

1.3. Prevalencia de HPV de alto riesgo a nivel mundial y en Ecuador.

El virus del Papiloma infecta la piel y la mucosa epitelial de vertebrados, se ha evidenciado la presencia del virus en mamíferos, aves, tortugas y serpientes, se sugiere que puede estar presente de manera ubicua entre la mayoría de los amniotas actuales (Bernard et al., 2010). Los tipos de virus que se han reportado en humanos se los denomina "*Papilomavirus Humano*" (HPV) y son considerados los agentes etiológicos del cáncer cervical, el segundo más frecuente en mujeres (zur Hausen, 2009), y además se los asocia a causar un amplio rango de enfermedades que van desde lesiones benignas a tumores invasivos.

Los virus del Papiloma Humano de alto riesgo causa particular importancia en el estudio de enfermedades humanas, son transmitidos por contacto sexual y son controlados por el sistema inmune en los próximos dos años, en ocasiones al año es eliminado, la persistencia de los virus es el proceso causante de cáncer en mujeres, además, los HPV de alto riesgo causan cáncer de ano, orofaringe y cáncer en las mucosas no queratinizadas y piel del tracto genital inferior como la vagina, vulva y pene (Bosch et al., 2013). Existen 13 tipos de HPV de alto riesgo que han sido caracterizados con una alta probabilidad de ser carcinogénicos, entre ellos HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68. Según el estudio realizado por Guan et al., (2012) de los HPV de alto riesgo el HPV-16 es el que presenta mayor frecuencia a nivel mundial con aproximadamente el 60%, seguidamente se encuentra HPV-18 con un aproximado de 15% (Guan et al., 2012).

En Ecuador en el estudio realizado por Bedoya-Pilozo et al., (2017) a mujeres con bajo y alto grado de lesiones cervicales y cáncer para la región litoral, reporta que HPV-16 es el más frecuente con 38,9 % y reporta a HPV-58 como segundo más frecuente 19,5%. Por otra parte, en el estudio realizado por Dalgo Aguilar et al., (2017) en mujeres con pre maligna y maligna citología cervical de la región sur del Ecuador, reporta a HPV-16 como el más frecuente con 53,2% y a HPV-18 con 38,8% como segundo más frecuente. Otro estudio realizado por Mejía, Muñoz, Trueba, Tinoco, & Zapata., (2016) a mujeres que presentan lesiones cancerosas y precancerosas, reportan a HPV-16 como el más frecuente con 41,8% y HPV-58 como segundo más frecuente con 30,5%. Teniendo como antecedentes estos estudios, en Ecuador los HPV de alto riesgo que presentan más frecuencia son HPV-16, 18 y 58 (Bedoya-Pilozo et al., 2017; Dalgo Aguilar et al., 2017; Mejía, Munoz, Trueba, Tinoco, & Zapata, 2016).

1.4. Diagnóstico de HPVs.

Los programas de screening por medio de pruebas de citología cervical (Papanicolaou "Pap") han reducido la mortalidad y la incidencia de HPV a nivel mundial, para poder tener el screening efectivo se ha creado un sistema de nomenclatura que es usado internacionalmente en la interpretación de resultados obtenidos de las pruebas citológicas e histológicas (Schiffman et al., 2016).

En pruebas histológicas se incluye la escala de neoplasia intraepitelial cervical (CIN por sus siglas en inglés), para lesiones escamosas y distinguidas CIN1, se incluye displasia leve, CIN2 para displasia moderada y CIN3 para displasia severa y carcinoma in-situ, se mide la fracción del epitelio que ha sido reemplazado por células indiferenciadas. La escala CIN no es usada siempre, por ejemplo, en Estados Unidos para lesiones anogenitales se usa la terminología LAST (lower Anogenital Squamous Terminology) (Darragh et al., 2012) donde se agrupa a las lesiones precursoras escamosas en dos niveles, lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL) y lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado (HSIL) (Schiffman et al., 2016).

En las pruebas citológicas dentro del screening se incluye la clasificación original de Papanicolaou, donde se usan los criterios de I a V según el grado de la pérdida de maduración del citoplasma de las células del cuello uterino y la atipia citológica que hace referencia a células mitóticas anormales y cambios en la forma y tamaño del núcleo.

El sistema Bethesda es un sistema descriptivo para encuentros anormales que se aproximan a la historia natural de HPV, incluyendo la descripción negativa para lesiones intraepiteliales y malignidad (NILM) y células escamosas atípicas indeterminadas (ASC-US) (Schiffman et al., 2016).

Adicional a las técnicas mencionadas actualmente existen otras técnicas **tabla1** usadas en el diagnóstico de HPVs.

Tabla 1. Técnicas clínicas y moleculares para diagnóstico de HPV.

Técnica	Sistema	Producto
Citología Cervical	Tecnología de base líquida ThinPrep Imaging System (ThinPrep, Hologic Corp, MA)	Bethesda: NILM
		ASC-US
		LSIL
		HSIL
		ASC-H
Captura de Híbridos 2 (HC2)	HC2: Digene Corporation, Gaithersburg, MD, USA	Puede detectar la infección por alguno de los 13 tipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68) y VPH de bajo riesgo (tipos 6, 11, 42, 43 y 44) pero no es posible identificarlos por separado.
PCR	PCR convencional	Amplio espectro de genomas de HPV enfocados en la región L1
	Primer universal	
	Primer Específico	Tipificar genes E (E6 y E7)
		Gel de agarosa permite visualizar las bandas
	PCR Clinical Arrays (Genómica SA, España)	Detecta infecciones únicas o múltiples por 35 tipos de VPH (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 61, 62, 66, 70, 71, 72, 73, 81, 82, 83, 84, 85, 89)
Real Time PCR	MuDT™(Multiple Detection Temperatures) Technology.	Puede detectar 14 tipos de alto riesgo en una sola reacción.
	High multiplex Real-time Quantitative PCR	

		<p>Permite confirmar múltiples (cinco o más) secuencias específicas.</p> <p>Permite cuantificar los test de múltiples muestras clínicas, basados en el análisis de la temperatura con la curva de Melting</p>
Secuenciamiento	<p>Sanger</p> <p>Next Generation Sequencing (NGS)</p>	<p>Permite generar las secuencias nucleotídicas de los genotipos de HPV obtenidas en los métodos anteriores, para determinar linajes, sublinajes, mutaciones de los diferentes genotipos de HPV</p>

Información obtenida de: (Chacón et al., 2007; Koliopoulos et al., 2010; Solomon et al., 2002; J. Yang et al., 2017)

Con los diferentes sistemas que existen se puede tener un diagnóstico efectivo, además se puede agregar el diagnóstico molecular para ayudar a tener una mejor medida de screening con referencia al riesgo, así dar prioridad a pacientes con mayores factores de riesgos para el desarrollo de cáncer cervical.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Evaluación de Iniciadores

2.1.1. Selección bibliográfica de iniciadores.

Se realiza una búsqueda bibliográfica exhaustiva en bases de datos como: NCBI, Sciencedirect, Researchgate, Scopus, Jstore, Google Scholar, SciELO, entre otras, (además en este estudio se usó la base de datos proporcionada por Cesar Bedoya). Para la búsqueda se usan palabras claves como: Phylogeny of HPV, Diversity of HPV, Classification of HPV, primers for HPV, HPV16,18 y 58 ORF E1, E2, E4, E5, E6, E7, E6/E7, LCR, L1, L2. En este estudio para HPV16 se encontró la lista de iniciadores que se observa en el Anexo C, total 68 iniciadores (34 pares), para HPV18 se encontró la lista que se puede observar en el Anexo D, total 42 iniciadores (21 pares) y para HPV58 se encontró la lista que se observa en el Anexo E, total 96 iniciadores (48 pares), sumando 206 iniciadores totales. Se considera que la muestra es significativa (n=206) para poder realizar los análisis que se describen seguidamente.

2.1.2. Parámetros y criterios de evaluación.

La Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) es una técnica aplicada en estudios biológicos y en el campo de la medicina, para que la PCR funcione eficientemente se necesita diseñar los iniciadores, para lo cual, hay que considerar múltiples parámetros de forma simultánea, en los estudios realizados por Housley et al. (2006); Yuryev et al. (2002); Andreson et al. (2008) y Boyle et al. (2009) consideran los siguientes criterios necesarios para un correcto funcionamiento de iniciadores: (i) longitud del iniciador, (ii) diferencia de longitud entre el par de iniciadores, (iii) contenido de GC del iniciador, (iv) composición de nucleótidos en la terminación 3' del iniciador, (v) tamaño del producto de la PCR, (vi) concentración de reactivo buffer para PCR, (vii) estructura secundaria estable (eliminación de dímeros y horquillas), (viii) temperatura melting del iniciador y (ix) diferencia de temperatura melting del par de iniciadores (Andreson, Mos, & Remm, 2008; Boyle, Dallaire, & MacKay, 2009; Housley, Zalewski, Beckett, & Venta, 2006; Yuryev et al., 2002).

Para este estudio consideramos los siguientes parámetros descritos a continuación, asumiendo los criterios necesarios para cada parámetro como se describen en la bibliografía.

2.1.2.1. Longitud del iniciador y diferencia de longitudes entre el par de iniciadores.

En el estudio realizado por Wu et al. (2004), se considera que para realizar una PCR optima la longitud del iniciador va de 16 a 28 nt y la diferencia entre ellos no tiene que ser mayor a 3 nt (J. S. Wu, Lee, Wu, & Shiue, 2004).

2.1.2.2. Contenido de GC.

El contenido de GC mide el porcentaje que indica el ratio entre los nucleótidos G y C que se encuentran en el iniciador, usualmente el porcentaje adecuado de GC va en el rango 40-60%, la comprobación del porcentaje de GC para cada iniciador (forward y reverse) que se encuentran en una región específica y puede afectar indirectamente a las condiciones de reconocimiento de la secuencia objetivo (Chuang, Cheng, & Yang, 2013).

2.1.2.3. Temperatura Melting (T_m) y diferencia de T_m entre el par de iniciadores.

La consideración de la temperatura melting es uno de los valores críticos en el rendimiento de PCR, mediante los estudios realizados por Wallace et al., (1979); Sambrook et al., (1989); You et al., (2008) se establece que la temperatura melting ideal para un par de iniciadores se encuentra en el rango 50 – 62°C, la diferencia de temperatura entre los dos iniciadores (forward y reverse) no debe exceder los 5°C, lo ideal es que la diferencia de T_m sea cero, ya que, en una PCR se trabaja con los dos iniciadores en las mismas condiciones (Chuang et al., 2013; Green & Sambrook, 2012; Wallace et al., 1979; You et al., 2008).

2.1.2.4. Formación de Dímeros.

EL apareamiento entre dos iniciadores tiene como resultado la formación de un dímero, lo que conlleva a resultados no eficientes en el producto final de la PCR, se debe evitar la hibridación de los iniciadores. La formación de dímeros se puede dar cuando: (i) el iniciador forward se pega al iniciador reverse; (ii) cuando los iniciadores se complementan entre sí, es decir, cuando un iniciador reverse se une con otro iniciador reverse. Es necesario tomar en cuenta este parámetro porque hay que asegurar que el iniciador se hibridar con la secuencia molde (Vallone & Butler, 2004).

2.1.2.5. Formación de horquilla.

Los iniciadores se puede complementar entre ellos, es decir, un segmento es complementario a otro segmento del mismo iniciador, forma una estructura secundaria

conocida como “horquilla”, es necesario evaluar al iniciador forwards y reverse individualmente, para asegurar que los iniciadores pueden hibridar con la secuencia molde (Chuang et al., 2013).

2.1.3. Análisis de los parámetros usando la herramienta OligoCalc.

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator es una herramienta en línea (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) creada por la universidad de Northwestern, OligoCalc permite determinar la mayoría de los criterios establecidos para la evaluación independiente de los pares de iniciadores.

2.1.3.1. Temperatura de melting (Tm).

Para calcular Tm de cada iniciador OligoCalc se basa en la relación sobre la entropía, entalpia, energía libre y temperatura, donde:

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S$$

El cambio en el orden o en la medida de la aleatoriedad de los oligonucleótidos (entropía) y la relación de absorbanza de calor por el oligonucleótido (entalpia) son calculados por la suma de los valores del par de nucleótidos obtenidos en el modelo desarrollado en el estudio de Sugimoto et al., (1996).

La relación entre la energía libre y la concentración de reactivos y productos es dada por:

$$\Delta G = RT \ln \left(\frac{[DNA \cdot primer]}{[DNA][primer]} \right)$$

Donde:

[DNA*primer]= concentración del DNA y el iniciador unidos.

[DNA]= la concentración de la secuencia de DNA no unida al iniciador.

[primer]= concentración del iniciador no unido a la secuencia molde.

Se sustituye ΔG :

$$\Delta H = T\Delta S + RT \ln \left(\frac{[DNA \cdot primer]}{[DNA][primer]} \right)$$

Se despeja T y se obtiene:

$$T = \frac{\Delta H}{\Delta S + R \ln \left(\frac{[DNA \cdot primer]}{[DNA][primer]} \right)}$$

Para simplificar la ecuación se asume que $[DNA]$ y $[DNA*primer]$ son iguales, ya que, $[primer]$ está en exceso a la secuencia molde de DNA y el punto melting es donde la concentración del iniciador unido y DNA no unido está en equilibrio, es decir, cuando el 50% del iniciador se encuentra hibridado y el otro 50% del iniciador aún no se hibrida con la cadena molde. Si las dos cadenas se encuentran en concentraciones iguales, la concentración efectiva viene dada por 0,25 del total de la concentración del oligonucleótido (Wetmur, 1991).

OligoCalc considera que el cambio de la energía libre es de 3,4 Kcal al igual que Sugimoto et al., (1996) y finalmente se adiere a la formula un valor ajustado para las sales, quedando la siguiente ecuacion final:

$$T = \frac{\Delta H - 3.4 \frac{kcal}{^{\circ}K mole}}{\Delta S + R \ln\left(\frac{1}{[primer]}\right)} + 16.6 \log_{10}([Na^+])$$

Se ajusta la variable para la concentración de las sales y se determinan los parámetros para 1Molar de NaCl. El cálculo de la termodinámica asume que la hibridación ocurre en un pH igual a 7, para la Temperatura melting (Tm) se determina que las secuencias del par de iniciadores no son simétricas y contiene al menos una Guanina (G) o una Citosina (C). La exactitud del cálculo disminuye luego de los 20nt, por lo cual, para establecer el análisis OligoCalc usa secuencias con rangos de 14 a 20nt.

2.1.3.2. Formación de Dímeros y horquilla.

Para calcular la auto-hibridación de los iniciadores, OligoCalc usa los modelos establecidos por Hilbers et al., (1994) y para calcular la formación de horquilla OligoCalc usa los modelos establecidos por Serra et al., (1999). Una vez realizados los análisis, OligoCalc muestra como resultado una estructura basada en la homología y el tamaño de la homología y restricciones para los extremos 3', además, OligoCalc indica el tamaño de la horquilla colocando en rojo la región de nucleótidos que se complementan (Hilbers, Heus, van Dongen, & Wijmenga, 1994; Serra, Lyttle, Axenson, Schadt, & Turner, 1993).

Para este estudio se tomaron 5 nt mínimos requeridos para que un iniciador forme un dímero y 4 pb para que un iniciador forme una horquilla. Por ejemplo, en el análisis de iniciador **HPV-16-E1-R** (AAAAAGCTTTAATGTGTTAGTATTTTGTCTGACACAC) usado en el estudio de Siddiga & Bhatti, (2016) se observa que el potencial de formación de horquilla se da en tres regiones del iniciador con 4pb en cada una.

5' AAAAAGCTTTAATG**TGTG**TTAGTATTTTGCCTGACACAC 3'
 5' **AAAA**AGCTTTAATG**TGTG**TTAGTAT**TTTT**GCCTGACACAC 3'
 5' **AAAA**AGCTTTAATG**TGTG**TTAGTAT**TTTT**GCCTGACACAC 3'

Para el mismo iniciador se observa que el potencial de formar un dímero se da en tres regiones diferentes del iniciador, la primera con 8nt, la segunda con 6nt y la tercera con 6nt.

5' AAAAAGCTTTAATG**TGTG**TTAGTATTTTGCCTGACACAC 3'
 3' CACACAGTCCTGTTTTAT**GATTG**TGTAATTTTCGAAAAA 5'

5' AAAAAGCT**TTAATG**TGTAGTATTTTGCCTGACACAC 3'
 3' CACACAGTCCTGTTTTATGATTG**TGTAATTTTCG**AAAAA 5'

5' AAAAAGCTTTAATG**TGTG**TTAGTATTTTGCCTGACACAC 3'
 3' CACACAGTC**CTGTTT**TATGATTG**TGTAATTTTCG**AAAAA 5'

Lo que quiere decir que, el iniciador **HPV-16-E1-R** posee una alta probabilidad de formar dímeros y horquillas mientras se encuentra en el proceso de la PCR, por tal motivo, con los análisis in-silico usando la herramienta OligoCalc se clasifica a dicho iniciador como no muy confiable para el estudio de diagnóstico molecular.

Se resumen los parámetros con los respectivos criterios en la tabla 2 que fueron usados previamente en estudios de filogenia molecular de HPV16, 18 y 58. Partiendo del estudio de Cárdenas, (2016) se creó una matriz que establece un valor máximo y un valor mínimo que puede tomar cada parámetro para considerarlos eficientes en el proceso de PCR.

Tabla 2. Parámetros con sus respectivos criterios de evaluación para cada par de iniciadores encontrados en la bibliografía.

Parámetros	Criterios
	<5
Formación de Dímeros (nt)	5
	>5
Formación de Horquilla (nt)	<4

	4
	>4
	<50
	50-62°C
Temperatura melting (Tm)	62,1-63
	63,1-64
	>64
	0
	1-1,9
Diferencia de Tm para el par de iniciadores (°C)	2-2,9
	3-3,9
	4-4,9
	>=5
	<30
	30-39
%GC	40-60
	61-70
	>70
	0
	1
	2
Degeneración (nt)	3
	4
	>=5
	0-3

Diferencia de longitud entre el par de iniciadores (nt)	>3
---	----

Para la identificación de los criterios cada iniciador es evaluado de forma in-silico usando la herramienta OligoCalc.

Fuente: Adaptada de (Cárdenas, 2016)

2.1.3.1. Especificidad.

Para que el resultado de PCR sea válido, es necesario evaluar que los iniciadores se asocien a las regiones que se quieren amplificar de forma específica, es decir, se determina si el iniciador se hibrida con la región objetivo. Existen herramientas bioinformáticas que ayudan a identificar los criterios (Chuang et al., 2013), en este estudio usamos Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) perteneciente a National Center for Biotechnology Information (NCBI), BLAST encuentra regiones similares entre secuencias biológicas, comparando secuencias de nucleótidos o proteínas con la base de datos de NCBI y calcula significancias estadísticas necesarias para adoptarlas en este estudio, como parámetros de evaluación de los iniciadores, los parámetros que se asumen son: Puntuación Máxima, Porcentaje de cobertura, E-value, Identidad y homología con los últimos tres nucleótidos (3') con secuencias no pertenecientes a HPV en análisis.

2.1.4. Análisis de los parámetros de especificidad usando BLAST.

Usando la herramienta BLAST se introduce la secuencia del iniciador en estudio y para la comparación con la base de datos se usa únicamente organismos pertenecientes a Papillomaviridae, además se usa megablast, comparando la secuencia molde únicamente con las secuencias de mayor similitud, los parámetros con sus respectivos criterios son descritos en la tabla 3. Para la comparación se usan las diez primeras secuencias de las bases de datos, por lo que, el criterio de evaluación es el promedio de estas diez secuencias de comparación.

Tabla 3. Parámetros con su respectivo criterio de evaluación para la especificidad de los iniciadores.

Parámetro	Criterio
Puntuación Máxima	>= 40
	30-39
Cobertura (%)	100
	90-99
E-value	0 - 0,001

	0,0011 - 0,01
	0,011 - 0,1
	0,11- 1
	≥ 1
Identidad (%)	100
	90-99
Especificidad 3' homología	0
de últimos 3 nt con	1
secuencias diferentes a	2
HPV	3

Fuente: Adaptada de (Cárdenas, 2016)

Las tablas 2y3 se basan en el estudio de Cárdenas, (2016) y proporcionan los datos necesarios para ser aplicados en la creación de la matriz de evaluación, en este estudio se consideran los parámetros descritos como necesarios en la evaluación de iniciadores usados previamente en estudios de filogenia molecular para HPV16, 18 y 58.

2.2. Análisis Ridit.

Análisis Ridit es una técnica descriptiva que compara grupos de observaciones y medidas que se encuentran asociadas a estudios de variables categóricas, en especial variables ordinales, Bross, (1958) introduce el análisis Ridit como un vínculo entre las pruebas-t y la prueba X^2 , debido que al usar el estadístico X^2 se pierde la información obtenida del ordenamiento de la variable categórica y cuando se recurre a la prueba-t implica usar asunciones injustificadas (Bross, 1958).

Ridit representa una transformación relativa a una distribución empírica en contraste con el modelo Probits que viene siendo relativo a una distribución uniforme dentro de un intervalo [-1.1]. Bross, (1958) establece que existe una relación entre el análisis Ridit y los métodos de distribución libre y se instituye a Ridit como un sistema de scoring (puntaje) donde el objetivo se basa en el análisis comparativo de frecuencia de distribución de la respuesta de la variable.

2.2.1. Scoring Ridit en variables categóricas.

Ridit no contienen restricciones para el tipo de datos pudiéndose usar variables discretas o variables categóricas, en este estudio usaremos variables ordinales que representan

categorías clasificadas como Bueno, Medio y Malo, de esta manera se intenta cuantificar el nivel de variabilidad de cada parámetro indicador de funcionamiento del juego de iniciadores.

Sea K_t el número de categorías ordenadas para los parámetros indicadores de t , y $P_t = (P_{t1}, \dots, P_{tk_t})$ las proporciones de los criterios de las respuestas observadas en el conjunto de datos originales. Para el criterio categórico i del parámetro t , se asigna el scoring siguiente:

$$B_{ti} = \sum_{j < i} P_{tj} - \sum_{j > i} P_{tj} \quad ; \quad i = 1, 2, 3 \dots \dots, k_t^a$$

Por ejemplo, para el parámetro “*Posibilidad de Dimerización*” usando la herramienta estadística Statgraphics Centurion XVII se obtienen las frecuencias:

Tabla 4. Tabla de Frecuencias para Posibilidad de Dimerización (nt)

Clase	Valor	Frecuencia	Frecuencia Relativa	Frecuencia Acumulada	Frecuencia Rel. Acum.
1	Bueno	175	0,8495	175	0,8495
2	Malo	30	0,1456	205	0,9951
3	Medio	1	0,0049	206	1

Se usaron 206 iniciadores para calcular la tabla de frecuencias.

Se usan las frecuencias relativas (proporciones) y el Ridit para los criterios se calculan de la siguiente manera:

Bueno (1):

$$B_{(1)} = 0 - (0,1456 + 0,0049)$$

$$B_{(1)} = -0,1407$$

Malo (2):

$$B_{(2)} = 0,8495 - 0,0049$$

$$B_{(2)} = 0,8446$$

Medio (3):

$$B_{(3)} = (0,8495 + 0,1456) - 0$$

$$B_{(3)} = 0,9951$$

^a Ecuación obtenida de (Roa, 2015)

Ahora las variables ordinales poseen su propio valor numérico, es decir, dentro del parámetro “*Posibilidad de Dimerización*” el criterio “*Bueno*” ahora se denomina “-0,1407”

2.2.2. Scoring Ridit según Bross.

Según Bross, (1958) se usa la frecuencia para el obtener el scoring Ridit, para el criterio categórico i del parámetro t , se asigna el scoring siguiente:

$$R_{ti} = (\pi_{i-1} + P_i/2) / \sum_{t=1}^i P_j^b$$

Tabla 5. Cálculo Ridit para el parámetro Posibilidad de Dimerización.

Criterio	A	B	C	D	E
1.Bueno	175	87,5	0	87,5	0,429
2.Malo	30	15	175	190	0,922
3.Medio	1	0,5	205	205,5	0,998
Total	102		102		

Para calcular el Ridit de la frecuencia de datos obtenidos se procede de la siguiente manera:

Columna A: Frecuencia de los criterios establecidos. (P_i)

Columna B: La mitad de la columna A ($P_i/2$)

Columna C: Acumulado de la columna A desplazado hacia abajo en una celda. ($\pi_{i-1} = \sum_{j=1}^{i-1} P_j$)

Columna D: La suma de la columna B y la columna C ($\pi_{i-1} + P_i/2$)

Columna E: Ridit. Columna D dividido para el total de datos. ($(\pi_{i-1} + P_i/2) / \sum_{j=1}^3 P_j$)

2.2.3. Justificación heurística del traslado de Ridit de Bross al Ridit de variables paramétricas.

Las puntuaciones Ridit obtenidas en el modelo de Bross no se encuentran dentro del intervalo de la distribución uniforme que se usa en este estudio, sin embargo, la puntuación Ridit para variables categóricas (B_{ti}) está linealmente relacionada con el modelo de Bross, si (R_{ti}) es el scoring original de Bross, para la categoría i del parámetro t , entonces (B_{ti}) = $2(R_{ti}) - 1$, así se traslada la puntuación Ridit directamente a nuestro estudio. Dado que, el scoring Ridit para este estudio se encuentra dentro del intervalo [-1,1], ordenado de forma decreciente, donde, una respuesta con valor cercano a 1 indica

^b Ecuación obtenida de (Bross, 1958)

la posibilidad que el iniciador sea malo y una respuesta con valor cercano a -1 indica la posibilidad que el iniciador sea bueno.

2.3. Análisis de Componentes Principales.

El análisis de componentes principales (ACP) ayuda a visualizar las relaciones entre variables que muestran información en común, reduciendo el número total de variables por componentes principales, el primer componente principal define la mayor variabilidad de los datos, ACP no requiere la suposición de tener normalidad en la distribución de los datos.

Se tiene una serie de variables (X_1, X_2, \dots, X_p) y se calcula un nuevo conjunto de variables (y_1, y_2, \dots, y_p) icorreladas entre sí, y que las varianzas vayan de forma decreciente, es decir $y_1 > y_2 > \dots > y_p$. Cada y_j ($j=1, 2, \dots, p$) representa combinación lineal de las variables originales, es decir:

$$y_j = a_{j1}x_1 + a_{j2}x_2 + a_{j3}x_3 + \dots + a_{jp}x_p = a_j^0$$

siendo $a_j^0 = (a_{1j}, a_{2j}, \dots, a_{pj})$ un vector de constantes, y $x = \begin{matrix} x_1 \\ x_2 \\ \dots \\ x_p \end{matrix}$

Para mantener la ortogonalidad de la transformación el módulo del vector $a_j^0 = (a_{1j}, a_{2j}, \dots, a_{pj})$ tienes que ser 1, es decir, $a_j^0 \cdot a_j = 1$

Para obtener el primer componente se calcula escogiendo a_1 con el fin que y_1 tenga la mayor varianza posible, el segundo componente principal se estima calculando a_2 cumpliendo que y_2 no tenga correlación con y_1 , las variables aleatorias para (y_1, y_2, \dots, y_p) tienen cada vez menor varianza.

El valor máximo de la varianza $a_1^0 \cdot X$ entre los vectores a_1 es igual a λ_1 , siempre que cumplan $a_j^0 \cdot a_j = 1$, λ_1 representa el eigenvalor más alto de Σ y ocurre cuando a_1 es un eigenvector de Σ correspondiente al eigenvalor de λ_1 .

De la misma manera se calculan las componentes principales subsiguientes y_2, y_3, \dots, y_p , donde la j -ésima componente principal ($j= 2, 3, \dots, p$) queda representada por $a_j^0 X$ y a_j se escoge con el cumplimiento de $a_j^0 \cdot a_j = 1$ de tal manera que la varianza de $a_j^0 X$ sea el mayor valor entre las combinaciones de X y que no se encuentren en correlación con $j-1$ componentes principales siguientes.

2.3.1. Análisis de varianza.

Denominando la matriz $p \times p$ de eigenvectores como A , tenemos: $A=[a_1, a_2, \dots, a_p]$ y el vector de $p \times 1$ de las componentes principales por y , entonces: $Y = A^T X$ y la matriz de covarianzas de Y se denomina Λ y se encuentra representada de la siguiente manera:

$$\Lambda = \begin{pmatrix} \lambda_1 & 0 & 0 \\ 0 & \lambda_2 & 0 \\ 0 & 0 & \lambda_p \end{pmatrix}$$

Los eigenvalores se interpretan como varianzas correspondientes a los componentes principales. Si bien $\text{tr}(\Sigma) = \sigma_{11}, \sigma_{22}, \dots, \sigma_{pp}$ mide la variación total de las variables originales y la suma de las varianzas de las componentes está dada por:

$$\sum_{i=1}^p \text{Var}(Y_i) = \sum_{i=1}^p \lambda_i = \text{tr}(\Lambda) = \sum_{i=1}^p \text{Var}(X_i) \text{ } ^\circ$$

Lo que nos quiere decir que la suma de las varianzas de las variables originales $\sum_{i=1}^p \text{Var}(X_i)$ y la sumatoria de sus componentes principales $\sum_{i=1}^p \lambda_i$ son iguales, es decir, que se puede explicar mediante las componentes principales la variación medida por las variables originales.

[°] Ecuación tomada de Roa, (2005)

CAPÍTULO 3

ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Datos obtenidos del cálculo de scoring Ridit.

Usando la ecuación descrita anteriormente, se calculó el Ridit para todos los parámetros, obteniendo valores para los criterios Bueno, Medio y Malo, los resultados obtenidos se observan en la tabla 6 los espacios en blanco representan que ese parámetro solo contiene dos respuestas categóricas (Bueno-Malo; Bueno-Medio; Malo-Medio).

Tabla 6. Puntuaciones Ridit para los parámetros en estudio.

Parámetros	$B_{(1)}$	$B_{(2)}$	$B_{(3)}$
X1	-0,1407	0,8446	0,9951
X2	-0,1262	0,9806	0,8932
X3	-0,2184	0,8204	0,9612
X4	-0,4078	0,8835	0,7087
X5	-0,3512	0,9415	0,7073
X6	-0,0194	0,9806	
X7	-0,3689	0,7573	0,8738
X8	-0,2039		0,7961
X9	-0,0971		0,9029
X10	-0,0838	0,9853	0,9311
X11	-0,0631		0,9369
X12	-0,0194		0,9806

Donde:

X1: Formación de Dímeros (nt)

X3: Temperatura melting (Tm)

X5: %GC

X7: Diferencia de longitud (nt)

X9: Cobertura (%)

X2: Formación de Horquilla (nt)

X4: Diferencia de Tm (°C)

X6: Degeneración (nt)

X8: Puntuación Máxima

X10: E-value

X11: Identidad (%)

X12: Homología con no HPV

B₍₁₎: Bueno, B₍₂₎: Malo y B₍₃₎: Medio

Observando los datos obtenidos en la tabla6 se observa que la matriz cumple la justificación heurística manteniendo el ordenado de forma decreciente. Por ejemplo, la respuesta categórica para %GC el criterio “*Bueno*” se encuentra cercano a -1, mientras que, el criterio “*Malo*” se encuentra cercano a 1. Característica que se puede observar en todos los parámetros.

3.2. Datos obtenidos en la matriz de respuestas categóricas originales.

La tabla7 indica la matriz de respuestas categóricas originales, datos que fueron obtenidos del análisis in-silico usando las herramientas OligoCalc y Blast.

Tabla 7. Matriz con respuestas categóricas Originales

Nº	Iniciadores	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
1	HPV-16-E1-F	-5	0	-3	-1	0	0	-4	0	-4	0	0	0
2	HPV-16-E1-R	-5	-4	0		-3	0		0	-4	0	0	0
3	HPV16-1258-F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	HPV-16-1404 R	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
5	HPV-16-E2 -F	0	0	0	-2	0	0	0	0	-4	0	0	0
6	HPV-16-E2- R	0	0	0		-3	0		0	-4	0	0	0
7	HPV-16-E4-F	0	0	0	0	-3	0	0	-2	-4	-5	0	-3
8	HPV-16-E4-R	0	0	0		-3	0		-2	-4	-5	0	-3
9	HPV_16_E4F	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
10	HPV_16_E4R	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
.
.
206	HPV58L1-inner-4	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0

La tabla completa se la puede observar en el anexoF

Donde:

X1: Formación de Dímeros (nt)

X2: Formación de Horquilla (nt)

X3: Temperatura melting (Tm)

X4: Diferencia de Tm (°C)

X5: %GC

X6: Degeneración (nt)

X7: Diferencia de longitud (nt)

X8: Puntuación Máxima

X9: Cobertura (%)

X10: E-value

X11: Identidad (%)

X12: Homología con no HPV

Los valores categóricos son: 0: Bueno, -2,-3-4: Medio y -5: Malos.

Se tiene que tener presente que los criterios Diferencia de Tm y Diferencia de longitud poseen el mismo valor para cada unidad del par de iniciadores y se procede a colocar

el mismo valor en cada iniciador, paso necesario para crear la una matriz A= 206x12 con valores categóricos originales para cada parámetro. Se reemplazan los valores categóricos con los nuevos valores Ridit, quedando la tabla8.

Tabla 8. Matriz de datos con valores Ridit.

Nº	Iniciadores	X1	X2	X3	X4	X5	X..	X10	X11	X12
1	HPV-16-E1-F	0,845	-0,126	0,961	-0,408	-0,351	.	-0,084	-0,063	-0,019
2	HPV-16-E1-R	0,845	0,893	-0,218	-0,408	0,707	.	-0,084	-0,063	-0,019
3	HPV16-1258-F	-0,141	-0,126	-0,218	-0,408	-0,351	.	-0,084	-0,063	-0,019
4	HPV-16-1404 R	-0,141	-0,126	-0,218	-0,408	-0,351	.	-0,084	-0,063	-0,019
5	HPV-16-E2 -F	-0,141	-0,126	-0,218	0,709	-0,351	.	-0,084	-0,063	-0,019
6	HPV-16-E2- R	-0,141	-0,126	-0,218	0,709	0,707	.	-0,084	-0,063	-0,019
7	HPV-16-E4-F	-0,141	-0,126	-0,218	-0,408	0,707	.	0,985	-0,063	0,981
8	HPV-16-E4-R	-0,141	-0,126	-0,218	-0,408	0,707	.	0,985	-0,063	0,981
9	HPV_16_E4F	-0,141	-0,126	-0,218	-0,408	-0,351	.	-0,084	-0,063	-0,019
10	HPV_16_E4R	-0,141	-0,126	-0,218	-0,408	-0,351	.	-0,084	-0,063	-0,019
.
.
206	HPV58L1-inner-4	-0,141	-0,126	-0,218	0,000	-0,351	-0,097	-0,084	-0,063	-0,019

La tabla completa se la puede observar en el anexo G

Donde:

X1: Formación de Dímeros (nt)

X2: Formación de Horquilla (nt)

X3: Temperatura melting (Tm)

X4: Diferencia de Tm (°C)

X5: %GC

X6: Degeneración (nt)

X7: Diferencia de longitud (nt)

X8: Puntuación Máxima

X9: Cobertura (%)

X10: E-value

X11: Identidad (%)

X12: Homología con no HPV

Se observa que cada parámetro tiene su propio valor Ridit en cada iniciador. Por ejemplo, para el parámetro “Diferencia de Tm” el criterio “Bueno” ahora se denomina “-0,4078”, el criterio “Medio” ahora es “0,8835” y el criterio “Malo” se convierte en “0,7087”.

3.3. Análisis de Componentes Principales.

Una vez multiplicadas las matrices se obtiene la nueva matriz que se observa en la tabla9 se comprueba que es una matriz ortogonal porque la primera fila es igual a la primera columna y la matriz transpuesta A^T es igual a la matriz inversa A^{-1} .

Tabla 9. Matriz Ortogonal

Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₆	Y ₇	Y ₈	Y ₉	Y ₁₀	Y ₁₁	Y ₁₂
25,855	7,227	3,958	-2,038	7,515	0,389	5,228	0,639	7,858	-1,737	4,960	0,389
7,227	24,265	-0,503	-2,098	5,072	0,498	3,998	0,641	3,509	-0,329	3,402	1,605
3,958	-0,503	39,974	4,069	12,806	1,148	3,812	7,283	7,765	6,332	5,853	0,109
-2,038	-2,098	4,069	69,158	-2,151	1,972	8,590	-3,472	-0,231	-1,356	1,215	-0,611
7,515	5,072	12,806	-2,151	57,181	2,110	8,404	-1,058	4,206	1,734	3,125	1,641
0,389	0,498	1,148	1,972	2,110	3,922	-1,721	0,184	-0,388	-0,358	3,748	-0,078
5,228	3,998	3,812	8,590	8,404	-1,721	66,218	3,795	5,609	-2,142	0,388	-0,594
0,639	0,641	7,283	-3,472	-1,058	0,184	3,795	33,437	7,922	13,604	6,350	2,184
7,858	3,509	7,765	-0,231	4,206	-0,388	5,609	7,922	18,058	3,393	5,738	1,612
-1,737	-0,329	6,332	-1,356	1,734	-0,358	-2,142	13,604	3,393	17,237	-0,148	2,795
4,960	3,402	5,853	1,215	3,125	3,748	0,388	6,350	5,738	-0,148	12,180	-0,252
0,389	1,605	0,109	-0,611	1,641	-0,078	-0,594	2,184	1,612	2,795	-0,252	3,922

Usando la herramienta estadística IBM SPSS Statistics 24 se introduce la matriz que se observa en la tabla9 y se obtiene la matriz de correlación Anexo F, que nos permite determinar si las variables (y_1, y_2, \dots, y_p) son icorreladas.

Además, obtenemos la tabla de la varianza total explicada tabla 10, que manifiesta el número final de componentes principales necesarios para explicar la mayor variabilidad de los datos.

Tabla 10. Varianza Total Explicada

Componente	Total	Autovalores iniciales		Sumas de extracción de cargas al cuadrado		
		% de	%	Total	% de	% acumulado
		varianza	acumulado		varianza	
1	2,901	24,175	24,175	2,901	24,175	24,175
2	2,276	18,964	43,139	2,276	18,964	43,139
3	2,033	16,944	60,083	2,033	16,944	60,083
4	1,568	13,067	73,15	1,568	13,067	73,15
5	1,271	10,589	83,739	1,271	10,589	83,739
6	0,64	5,337	89,076			
7	0,489	4,075	93,15			
8	0,362	3,02	96,171			
9	0,301	2,511	98,682			
10	0,115	0,956	99,638			
11	0,043	0,362	100			
12	-3,13E-16	-2,61E-15	100			

Método de extracción: análisis de componentes principales.

La tabla 10 dice que cinco componentes principales explican aproximadamente el 83% de la variabilidad de los datos, el componente principal seis aporta apenas con 5% de la variabilidad de los datos, por tal motivo ya no se la toma en cuenta.

Mediante el gráfico de varianzas o gráfico de sedimentos asociado a los factores, es útil para fijar el número de factores que se tienen que retener. Como observamos en el Gráfico 3.1 los valores que se encuentran por encima de 1 son los que se retienen, encontramos los cinco componentes principales, además el gráfico muestra como la pendiente se encuentra de forma decreciente cumpliendo que $\lambda_1 > \lambda_2 > \lambda_3 > \dots > \lambda_{12}$, es decir, que existe la ruptura de la pendiente de forma escalar descendiente desde los factores más importantes hasta los restantes o sedimentos.

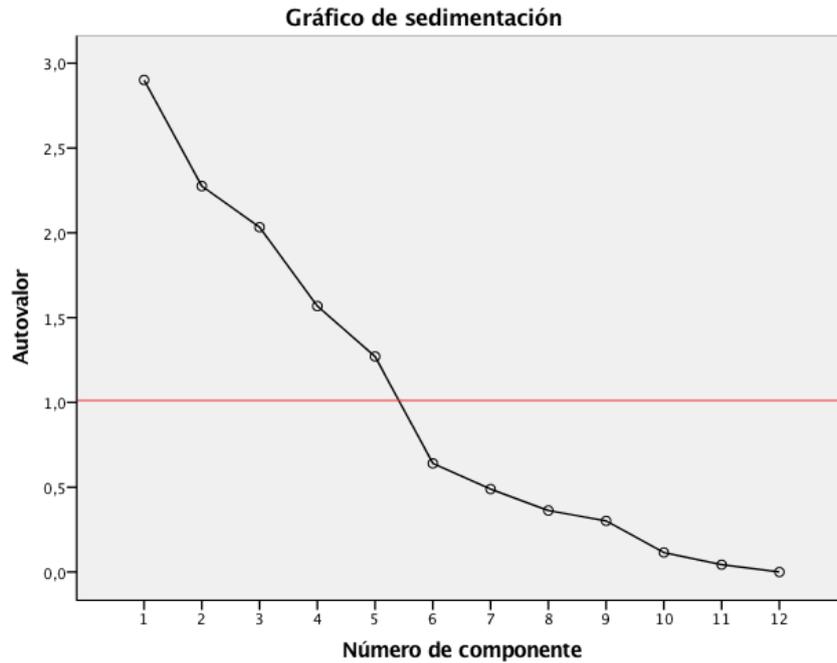


Figura 3.1. Gráfico de sedimentación de las componentes principales

En la figura 3.1 se observa que se retienen los valores que se encuentran por encima de la línea roja, los Autovalores representan el porcentaje de la variabilidad de los datos, para lo cual solo se retienen cinco componentes principales ya que la suma de ellos es aproximadamente el 83% de la explicación de la variabilidad de los datos.

En la tabla 11, se observan los valores que toman las variables en cada componente, el primer componente principal explica el 24% de la variabilidad de los datos, por lo que se usa el primer componente principal para determinar el score final de cada iniciador.

Tabla 11. Matriz de Componentes Principales.

Variables	Componente				
	1	2	3	4	5
y10	0,91	-0,249	0,105	0,015	0,114
y8	0,848	-0,009	0,145	0,195	-0,254
y12	0,702	-0,094	-0,34	-0,509	0,187
y1	-0,244	0,808	-0,172	-0,023	-0,063
y9	0,404	0,669	0,008	0,397	-0,161
y4	-0,509	-0,609	0,103	0,307	-0,114
y2	-0,204	0,503	-0,417	-0,463	-0,154
y6	-0,424	-0,086	0,793	-0,381	0,024
y11	0,028	0,554	0,715	0,01	-0,339
y7	-0,298	0,047	-0,55	0,659	0,022
y5	-0,164	0,353	0,016	-0,088	0,841
y3	0,202	0,197	0,479	0,466	0,518

Método de extracción: análisis de componentes principales.

La ecuación de calidad del iniciador queda definida de la siguiente manera:

$$CP_1 = 0,91X_{10} + 0,848X_8 + 0,702X_{12} - 0,244X_1 + 0,404X_9 - 0,509X_4 - 0,204X_2 - 0,424X_6 + 0,028X_{11} - 0,298X_7 - 0,164X_5 + 0,202X_3$$

Donde:

CP1: Score para cada iniciador,

X1: Formación de Dímeros (nt)

X3: Temperatura melting (Tm)

X5: %GC

X7: Diferencia de longitud (nt)

X9: Cobertura (%)

X11: Identidad (%)

X2: Formación de Horquilla (nt)

X4: Diferencia de Tm (°C)

X6: Degeneración (nt)

X8: Puntuación Máxima

X10: E-value

X12: Homología con no HPV

El Score Gráficamente queda representado de la siguiente manera:

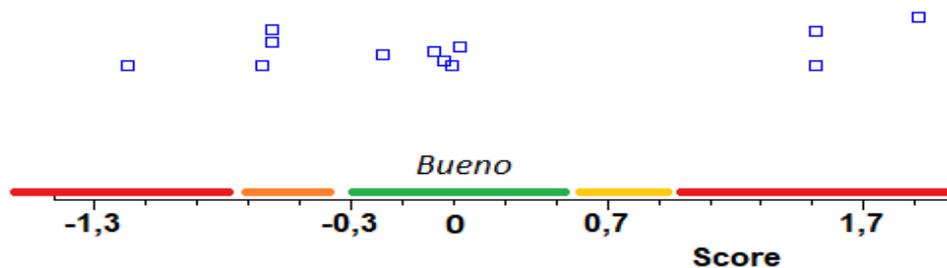


Figura 3.2. Representación de Score en la recta real.

La figura 3.2. hace representación de los valores obtenidos según la ecuación de calidad, donde, el valor que se encuentra en la región verde representa que el iniciador es de buena calidad y se sugiere usar para la investigación correspondiente, mientras que, el valor que se encuentra en la región de color rojo sugiere que el iniciador es de mala calidad.

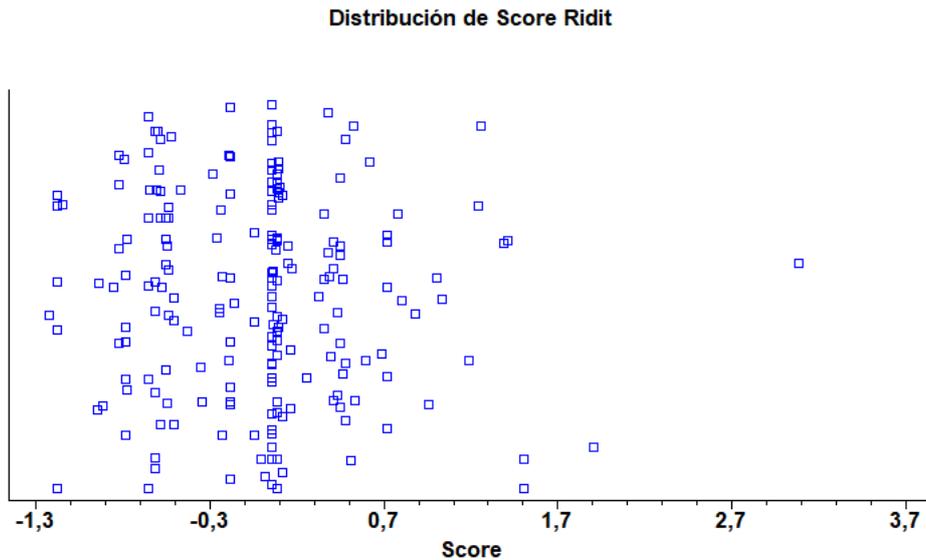


Figura 3.3. Distribución de los iniciadores usados en el estudio

La figura 3.3. representa la distribución para cada iniciador dentro del score, se puede observar que se asemeja a una distribución normal (-0.028; 0.6038) y se observa un valor atípico perteneciente al iniciador HPV-16-L2-F, encontrándose con puntuación lejana al 0, indicando que el iniciador es de mala calidad.

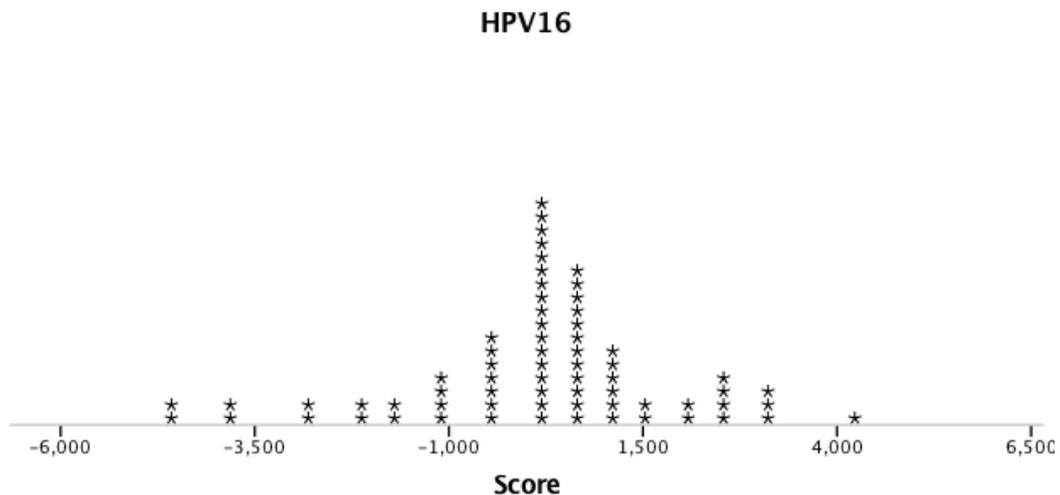


Figura 3.4. Evaluación de iniciadores usados en la filogenia molecular de HPV16.

Para HPV-16 se obtienen 18 iniciadores de buena calidad figura 3.4. indicando que, de los iniciadores obtenidos de la búsqueda bibliográfica, solamente el 26% tienen alta efectividad.

HPV58

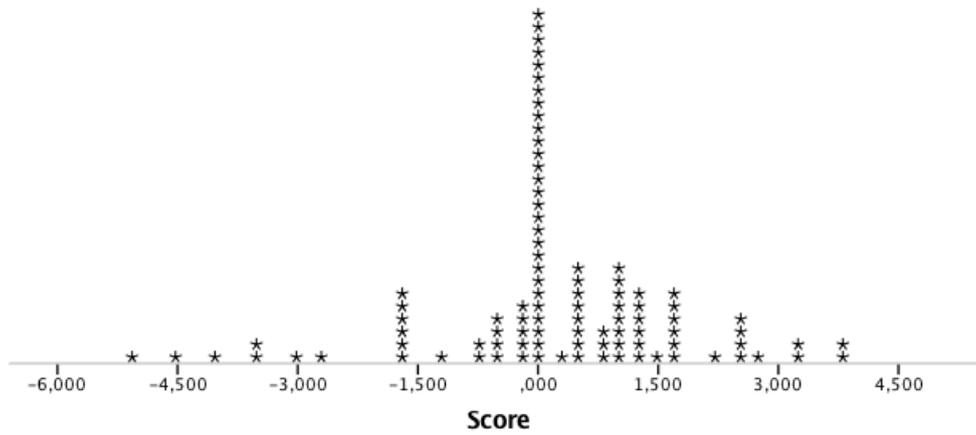


Figura 3.5. Evaluación de iniciadores usados en la filogenia molecular de HPV58.

Dentro de la evaluación de los iniciadores de HPV58 se obtiene 31 iniciadores de buena calidad figura 3.5., reflejando que únicamente el 32% de los iniciadores obtenidos de la búsqueda bibliográfica de estudios relacionados a filogenia molecular, son eficientes.

HPV18

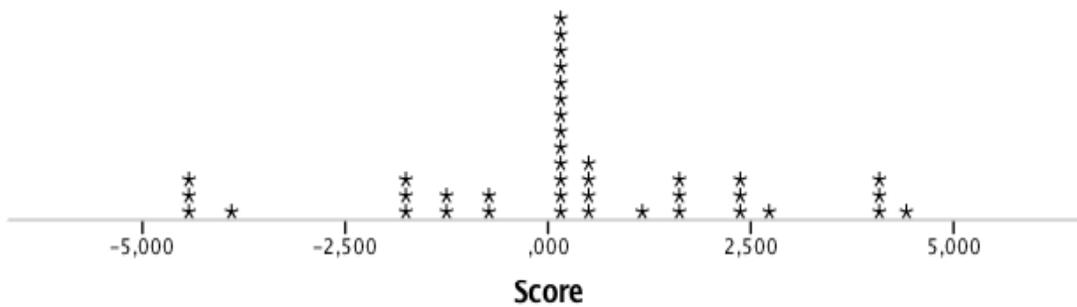


Figura 3.6. Evaluación de iniciadores usados en la filogenia molecular de HPV18.

Usando el modelo de evaluación se obtienen 13 iniciadores de buena calidad para HPV18 figura 3.6., únicamente el 31% son efectivos.

CAPÍTULO 4

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

1. La técnica Redit tiene importancia relevante en este estudio, comprobando que Redit es una técnica estadística eficiente al usar variables de tipo categóricas, ya que se logró transformar las respuestas categóricas a valores con intervalo $[-1,1]$, semejante a una distribución uniforme y así lograr tener una matriz de valores numéricos, la misma que permitió realizar las técnicas estadísticas correspondientes.
2. La técnica de Análisis de Componentes Principales en este trabajo ayudó a reducir el número de variables a cinco componentes principales, que representaron aproximadamente el 83% de la variabilidad de los datos. Se usó el primer componente principal para obtener el score de cada iniciador.
3. Mediante el uso de análisis Redit y Análisis de Componentes Principales se logró crear la matriz de evaluación de iniciadores que han sido usados en estudios de filogenia de Papiloma virus Humano HPV16, 18 y 58, consecuentemente se logró obtener un peso con valor numérico para cada variable, el mismo que ayudó a formar la ecuación de calidad que ayuda a evaluar los iniciadores de forma independiente.
4. Es importante tener base estadística que determine la eficiencia de iniciadores, más aún, si se trata del uso de iniciadores en la investigación sobre diagnóstico de enfermedades que desarrollan cáncer en humanos, ya que es de importancia tener la población preparada para la continua lucha contra el cáncer.
5. Usando el modelo de calidad se evaluó iniciadores usados en la filogenia molecular de HPV 16,18 y 58.

Recomendaciones

1. En este estudio se usó únicamente iniciadores pertenecientes a Papiloma virus Humano 16,18 y 58, se recomienda usar una matriz con iniciadores de otros organismos para aumentar la confiabilidad de los datos. Así mismo, se recomienda eliminar los iniciadores que no sean reconocidos en Blast o que tengan diferencias alejadas a los criterios obtenidos en la matriz de datos, ya que así se eliminan los valores aberrantes que afectan la confianza de la ecuación obtenida.
2. La ecuación se ajusta a ser usada independientemente para cada tipo de iniciador incluyendo los diseñados por el investigador, se recomienda mejorar el modelo matemático mediante pruebas de laboratorio, con el uso de iniciadores en diferentes pruebas moleculares, con el fin de obtener resultados confirmatorios de eficiencia del modelo.
3. Con pruebas de laboratorio establecer los rangos de calidad de los iniciadores.

BIBLIOGRAFÍA

- Andreson, R., Mos, T., & Remm, M. (2008). Predicting failure rate of PCR in large genomes. *Nucleic Acids Research*, 36(11). <http://doi.org/10.1093/nar/gkn290>
- Atun, R., De Andrade, L. O. M., Almeida, G., Cotlear, D., Dmytraczenko, T., Frenz, P., ... Wagstaff, A. (2015). Health-system reform and universal health coverage in Latin America. *The Lancet*, 385(9974), 1230–1247. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61646-9](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61646-9)
- Bae, J. H., Cheung, J. L. K., Lee, S. J., Luk, A. C. S., Tong, S. Y., Chan, P. K. S., & Park, J. S. (2009). Distribution of human papillomavirus type 58 variants in progression of cervical dysplasia in Korean women. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 19(9), 1051–1054. <http://doi.org/10.4014/jmb.0812.679>
- Bedoya-Pilozo, C. H., Medina Magües, L. G., Espinosa-García, M., Sánchez, M., Parrales Valdiviezo, J. V., Molina, D., ... Badano, I. (2017). Molecular epidemiology and phylogenetic analysis of human papillomavirus infection in women with cervical lesions and cancer from the coastal region of Ecuador. *Revista Argentina de Microbiología*, (xx). <http://doi.org/10.1016/j.ram.2017.06.004>
- Bernard, H., Burk, R. D., Chen, Z., Doorslaer, K. Van, & Villiers, E. De. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*, 401(1), 70–79. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2010.02.002>
- Bobek, V., Kolostova, K., Pinterova, D., Kacprzak, G., Adamiak, J., Kolodziej, J., ... Hoffman, R. M. (2010). A clinically relevant, syngeneic model of spontaneous, highly metastatic B16 mouse melanTransmission of Hepatitis C Virus in an Orthopedic Hospital Ward R.S. *Anticancer Research*, 30(12), 4799–4804. <http://doi.org/10.1002/jmv>
- Boer, M. A. De, Peters, L. A. W., Aziz, M. F., Siregar, B., Cornain, S., Vrede, M. A., ...

- Fleuren, G. J. (2005). Human papillomavirus type 18 variants : Histopathology and E6 / E7 polymorphisms in three countries, 425, 422–425.
<http://doi.org/10.1002/ijc.20727>
- Bogovac, Ž., Lunar, M. M., Kocjan, B. J., Seme, K., Jančar, N., & Poljak, M. (2011). Prevalence of HPV-16 genomic variant carrying a 63-bp duplicated sequence within the E1 gene in Slovenian women. *Acta Dermatovenerologica Alpina, Pannonica et Adriatica*, 20(3), 135–139.
- Bosch, F. X., Broker, T. R., Forman, D., Moscicki, A.-B., Gillison, M. L., Doorbar, J., ... Sanjosé, S. de. (2013). Comprehensive Control of Human Papillomavirus Infections and Related Diseases. *Vaccine*, 31, H1–H31.
<http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.10.003>
- Boyle, B., Dallaire, N., & MacKay, J. (2009). Evaluation of the impact of single nucleotide polymorphisms and primer mismatches on quantitative PCR. *BMC Biotechnology*, 9, 75. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-9-75>
- Bross, I. D. J. (1958). HOW to Use Ridit Analysis. *Biometrics*, 14(1), 18–38.
- Bzhalava, D., Eklund, C., & Dillner, J. (2015). International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*, 476, 341–344.
<http://doi.org/10.1016/j.virol.2014.12.028>
- Cárdenas, D. (2016). *DISEÑO Y EVALUACIÓN DE INICIADORES PARA EL DIAGNÓSTICO POR PCR DE HERPESVIRUS QUELÓNIDO 5 (CHHV5) EN TORTUGAS MARINAS DEL ECUADOR*. Escuela Superior Politécnica del Litoral.
- Carvalho, N. de O., del Castillo, D. M., Perone, C., Januário, J. N., de Melo, V. H., & Filho, G. B. (2010). Comparison of HPV genotyping by type-specific PCR and sequencing. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(1), 73–78.
<http://doi.org/10.1590/S0074-02762010000100011>
- Chacón, J., Sanz, I., Dolores Rubio, M., Luisa de La Morena, M., Díaz, E., Luisa Mateos,

- M., & Baquero, F. (2007). Detección y genotipado del virus del papiloma humano de alto riesgo en muestras de lesiones cervicales. *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 25(5), 311–316. <http://doi.org/10.1157/13102266>
- Chemes, L. B., Sánchez, I. E., Alonso, L. G., & de Prat-Gay, G. (2011). Intrinsic Disorder in the Human Papillomavirus E7 Protein. *Flexible Viruses: Structural Disorder in Viral Proteins*, 313–346. <http://doi.org/10.1002/9781118135570.ch12>
- Chen, A. A., Gheit, T., Franceschi, S., Tommasino, M., & Clifford, G. M. (2015). Human Papillomavirus 18 Genetic Variation and Cervical Cancer Risk Worldwide, 89(20), 10680–10687. <http://doi.org/10.1128/JVI.01747-15>
- Chen, Z., Jing, Y., Wen, Q., Ding, X., Zhang, S., Wang, T., ... Zhang, J. (2016). L1 and L2 gene polymorphisms in HPV-58 and HPV-33: implications for vaccine design and diagnosis. *Virology Journal*, 13(1), 1–12. <http://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. *Biotechnology Letters*, 35(10), 1541–1549. <http://doi.org/10.1007/s10529-013-1249-8>
- Dalgo Aguilar, P., Loján González, C., Córdova Rodríguez, A., Acurio Paéz, 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, 12–14. <http://doi.org/10.1155/2017/8572065>
- Darragh, T. M., Colgan, T. J., Cox, J. T., Heller, D. S., Henry, M. R., Luff, R. D., ... Spires, S. (2012). The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: Background and Recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 136(10), 1266–1297.

<http://doi.org/10.5858/arpa.LGT200570>

de Villiers, E.-M., Fauquet, C., Broker, T. R., & Bernard, H. (2004). Classification of papillomaviruses. *Virology*, *324*, 17–27. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2004.03.033>

Doorbar, J., Quint, W., Banks, L., Bravo, I. G., Stoler, M., Broker, T. R., & Stanley, M. A. (2012). The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine*, *30*(SUPPL.5), F55–F70. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.06.083>

Forman, D., & Sierra, M. S. (2016). Cancer in Central and South America: Introduction. *Cancer Epidemiology*, *44*, S3–S10. <http://doi.org/10.1016/j.canep.2016.04.008>

Gravitt, P. E., Peyton, C., Wheeler, C., Apple, R., Higuchi, R., & Shah, K. V. (2003). Reproducibility of HPV 16 and HPV 18 viral load quantitation using TaqMan real-time PCR assays. *Journal of Virological Methods*, *112*(1–2), 23–33. [http://doi.org/10.1016/S0166-0934\(03\)00186-1](http://doi.org/10.1016/S0166-0934(03)00186-1)

Green, M., & Sambrook, J. (2012). *Molecular cloning. Zool. Res.* (Vol. 33). Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://doi.org/10.3724/SP.J.1141.2012.01075>

Grillo-Ardila, C. F., Martínez-Velásquez, M. Y., & Morales-López, B. (2008). VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO: ASPECTOS MOLECULARES Y CÁNCER DE CÉRVIX
Molecular aspects of human papillomavirus and cervical cancer. *Revista Colombiana de Obstetricia Y Ginecología*, *59*(4), 310–315. Retrieved from <http://www.scielo.org.co/pdf/rcog/v59n4/v59n4a07.pdf>

Guan, P., Howell-Jones, R., Li, N., Bruni, L., De Sanjosé, S., Franceschi, S., & Clifford, G. M. (2012). Human papillomavirus types in 115,789 HPV-positive women: A meta-analysis from cervical infection to cancer. *International Journal of Cancer*, *131*(10), 2349–2359. <http://doi.org/10.1002/ijc.27485>

Hilbers, C. W., Heus, H. A., van Dongen, M. J. P., & Wijmenga, S. S. (1994). The Hairpin Elements of Nucleic Acid Structure: DNA and RNA Folding (pp. 56–104). Springer, Berlin, Heidelberg. http://doi.org/10.1007/978-3-642-78666-2_4

Housley, D. J. E., Zalewski, Z. A., Beckett, S. E., & Venta, P. J. (2006). Design factors that influence PCR amplification success of cross-species primers among 1147 mammalian primer pairs. *BMC Genomics*, 7, 1–11. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-7-253>

International Human Papillomavirus (HPV) Reference Center. (2017). Reference clones – hpvcenter.

Jenkins, A., Allum, A. G., Strand, L., & Aakre, R. K. (2013). Simultaneous detection, typing and quantitation of oncogenic human papillomavirus by multiplex consensus real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 187(2), 345–351. <http://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.10.021>

Koliopoulos, G., Arbyn, M., Martin-Hirsch Pierre, P. L., Kyrgiou, M., Prendiville Walter, J. P., & Paraskevaidis, E. (2010). Cytology versus HPV testing for cervical cancer screening in the general population. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (7). <http://doi.org/10.1002/14651858.CD008587>

Larsson, G. L., Helenius, G., Andersson, S., Elgh, F., Sorbe, B., & Karlsson, M. G. (2012). Human papillomavirus (HPV) and HPV 16-variant distribution in vulvar squamous cell carcinoma in Sweden. *International Journal of Gynecological Cancer*, 22(8), 1413–1419. <http://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31826a0471>

Magnusson, R. S., Patterson, D., Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., ... Caraher, M. (2014). The role of law and governance reform in the global response to non-communicable diseases. *Globalization and Health*, 10(1), 44. <http://doi.org/10.1186/1744-8603-10-44>

McBride, A. A. (2017). Mechanisms and strategies of papillomavirus replication. *Biological Chemistry*, 398(8), 919–927. <http://doi.org/10.1515/hsz-2017-0113>

Mejía, L., Munoz, 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(12), 144–152.
<http://doi.org/10.1002/jmv>
- Park, J. S., Shin, S., Kim, E.-C., Kim, J. E., Kim, Y. B., Oh, S., ... Yoon, J. H. (2016). Association of human papillomavirus type 16 and its genetic variants with cervical lesion in Korea. *Apmis*, n/a-n/a. <http://doi.org/10.1111/apm.12592>
- Roa, H. (2015). Modelo De Detección De Fraudes En Aseguramiento De Vehículos Utilizando Componentes Principales Y Análisis Ridit. *Instituto de Ciencias Matemáticas, Escuela Superior Politécnica Del Litoral*, (November), 64–102.
- Schiffman, M., Doorbar, J., Wentzensen, N., De Sanjosé, S., Fakhry, C., Monk, B. J., ... Franceschi, S. (2016). Carcinogenic human papillomavirus infection. *Nature Reviews Disease Primers*, 2. <http://doi.org/10.1038/nrdp.2016.86>
- Serra, M. J., Lyttle, M. H., Axenson, T. J., Schadt, C. A., & Turner, D. H. (1993). RNA hairpin loop stability depends on closing base pair. *Nucleic Acids Research*, 21(16), 3845–3849. <http://doi.org/10.1093/nar/21.16.3845>
- Siddiq, A., & Bhatti, M. F. (2016). Genetic variation of high-risk HPV-16 from a cervical cancer biopsy collected in Pakistan. *Future Virology*, 11(1), 31–38. <http://doi.org/10.2217/fvl.15.94>
- Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O'Connor, D., Prey, M., ... Young, N. (2002). The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *Jama*, 287(16), 2114–9. <http://doi.org/10.1097/00006254-200208000-00015>
- Stanley, M. A. (2012). Epithelial cell responses to infection with human papillomavirus. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(2), 215–222. <http://doi.org/10.1128/CMR.05028-11>
- Sun, Z., Ren, G., Cui, X., Zhou, W., Liu, C., & Ruan, Q. (2011). Genetic diversity of HPV-16 E6, E7, and L1 genes in women with cervical lesions in Liaoning Province, China.

International Journal of Gynecological Cancer : Official Journal of the International Gynecological Cancer Society, 21(3), 551–558.
<http://doi.org/10.1097/IGC.0b013e3182112023>

Vallone, P. M., & Butler, J. M. (2004). AutoDimer: A screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *BioTechniques*, 37(2), 226–231.

Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T., & Itakura, K. (1979). Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phiX 174 DNA: The effect of single base pair mismatch. *Nucleic Acids Research*, 6(11), 3543–3558.
<http://doi.org/10.1093/nar/6.11.3543>

Wetmur, J. G. (1991). DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization DNA Probes: Applications of the Principles of Nucleic Acid Hybridization. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 26(3/4), 227–259. <http://doi.org/10.3109/10409239109114069>

Wu, E. Q., Zha, X., Yu, X. H., Zhang, G. N., Wu, Y. G., Fan, Y., ... Kong, W. (2009). Profile of physical status and gene variation of human papillomavirus 58 genome in cervical cancer. *Journal of General Virology*, 90(5), 1229–1237.
<http://doi.org/10.1099/vir.0.008227-0>

Wu, J. S., Lee, C., Wu, C. C., & Shiue, Y. L. (2004). Primer design using genetic algorithm. *Bioinformatics*, 20(11), 1710–1717.
<http://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth147>

Yang, J., Nolte, F. S., Chajewski, O. S., Lindsey, K. G., Houser, P. M., Pellicier, J., ... Ehsani, L. (2017). Cytology and high risk HPV testing in cervical cancer screening program: Outcome of 3-year follow-up in an academic institute. *Diagnostic Cytopathology*, (September). <http://doi.org/10.1002/dc.23843>

Yang, L., Yang, H., Wu, K., Shi, X., Ma, S., & Sun, Q. (2014). Prevalence of HPV and Variation of HPV 16/HPV 18 E6/E7 Genes in Cervical Cancer in Women in South

West China. *JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY*, 30(12), 4799–4804.
<http://doi.org/10.1002/jmv>

You, F. M., Huo, N., Gu, Y. Q., Luo, M. C., Ma, Y., Hane, D., ... Anderson, O. D. (2008). BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics*, 9, 1–13. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-9-253>

Yue, Y., Yang, H., Wu, K., Yang, L., Chen, J., Huang, X., ... Li, Q. (2013). Genetic Variability in L1 and L2 Genes of HPV-16 and HPV-58 in Southwest China. *PLoS ONE*, 8(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0055204>

Yuryev, A., Huang, J., Pohl, M., Patch, R., Watson, F., Bell, P., ... Boyce-Jacino, M. T. (2002). Predicting the success of primer extension genotyping assays using statistical modeling. *Nucleic Acids Research*, 30(23), e131. <http://doi.org/10.1093/nar/gnf131>

zur Hausen, H. (2009). Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*, 384(2), 260–265. <http://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.046>

ANEXOS

Anexo A. Árbol filogenético para 189 PVs

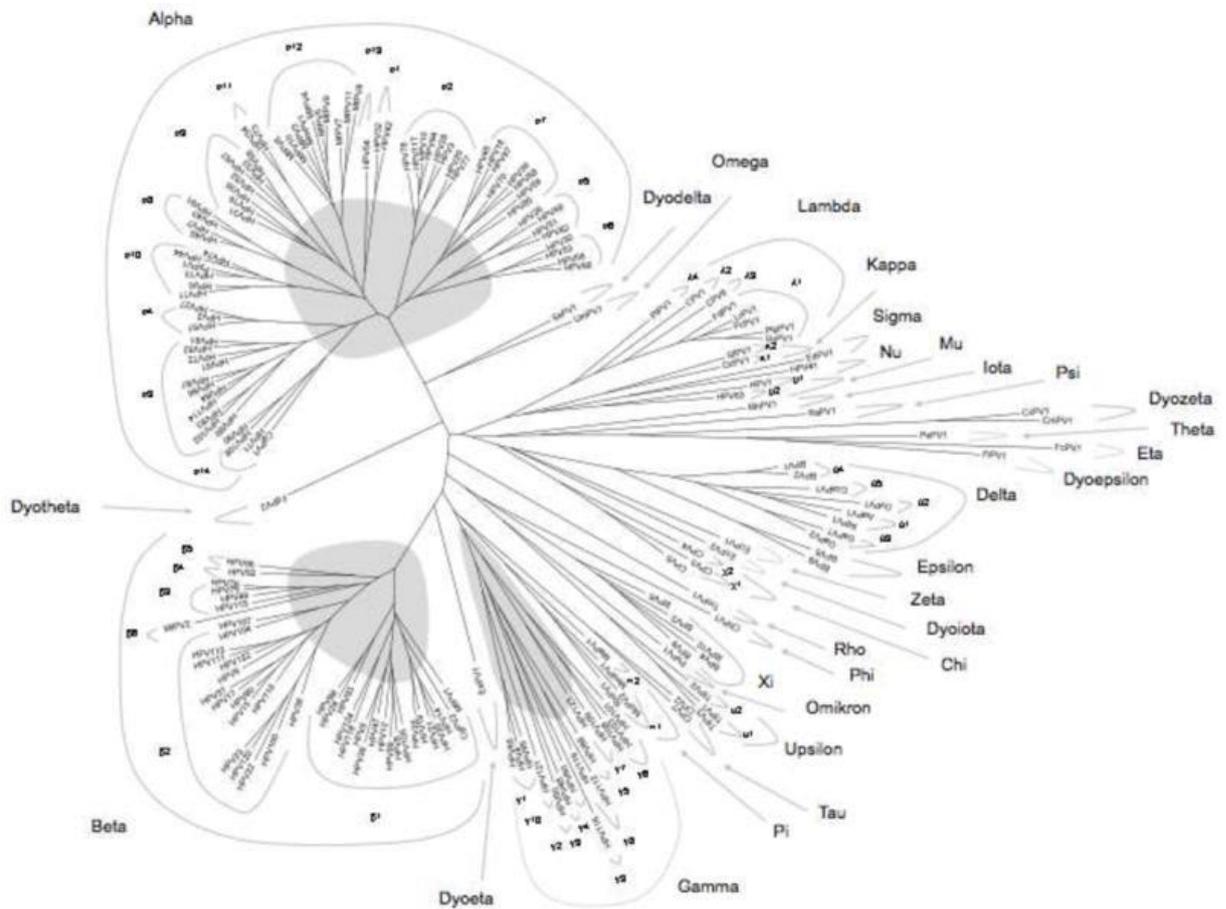


Figura 5.1. Árbol filogenético de la secuencia L1 para 189 PVs.

El análisis filogenético se basa en múltiples alineamientos de la secuencia de nucleótidos para la región L1 de 189 PVs con 10 millones de ciclos, con el algoritmo de Markov chain Monte Carlo (MCMC). Para la construcción Bayesiana se usó JModelTest v3.7 para identificar el mejor modelo evolutivo. Se identificó la variable Gamma en el modelo para la tasa de variación para cada sitio y permitir que todas las tasas de sustitución para las secuencias alineadas sean diferentes.

Fuente: (Bernard et al., 2010)

Anexo B. Tabla de clasificación de Papilomavirus.

Tabla 12. Clasificación taxonómica de Papilomavirus, género y especies.

genus	species (common use)	species (ICTV)
alphapapillomavirus	alpha-1	<i>Human Papillomavirus 32</i>
	alpha-2	<i>Human Papillomavirus 10</i>
	alpha-3	<i>Human Papillomavirus 61</i>
	alpha-4	<i>Human Papillomavirus 2</i>
	alpha-5	<i>Human Papillomavirus 26</i>
	alpha-6	<i>Human Papillomavirus 53</i>
	alpha-7	<i>Human Papillomavirus 18</i>
	alpha-8	<i>Human Papillomavirus 7</i>
	alpha-9	<i>Human Papillomavirus 16</i>
	alpha-10	<i>Human Papillomavirus 6</i>
	alpha-11	<i>Human Papillomavirus 34</i>
	alpha-12	<i>Macaca mulata Papillomavirus 1</i>
	alpha-13	<i>Human Papillomavirus 54</i>
	alpha-14	<i>Human Papillomavirus 90</i>
betapapillomavirus	beta-1	<i>Human Papillomavirus 5</i>
	beta-2	<i>Human Papillomavirus 9</i>
	beta-3	<i>Human Papillomavirus 49</i>
	beta-4	<i>Human Papillomavirus 92</i>
	beta-5	<i>Human Papillomavirus 96</i>
	beta-6	<i>Macaca fascicularis Papillomavirus 2</i>
gammapapillomavirus	gamma-1	<i>Human Papillomavirus 4</i>
	gamma-2	<i>Human Papillomavirus 48</i>
	gamma-3	<i>Human Papillomavirus 50</i>

	gamma-4	<i>Human Papillomavirus 60</i>
	gamma-5	<i>Human Papillomavirus 88</i>
	gamma-6	<i>Human Papillomavirus 101</i>
	gamma-7	<i>Human Papillomavirus 109</i>
	gamma-8	<i>Human Papillomavirus 112</i>
	gamma-9	<i>Human Papillomavirus 116</i>
	gamma-10	<i>Human Papillomavirus 121</i>
Deltapapillomavirus	delta-1	<i>Alces alces Papillomavirus 1</i>
	delta-2	<i>Odocoileus virginianus Papillomavirus 1</i>
	delta-3	<i>Ovis aries Papillomavirus 1</i>
	delta-4	<i>Bos taurus Papillomavirus 1</i>
	delta-5	<i>Capreolus capreolus Papillomavirus 1</i>
Epsilonpapillomavirus	epsilon-1	<i>Bos taurus Papillomavirus 5</i>
Zetapapillomavirus	Zeta-1	<i>Equus caballus Papillomavirus 1</i>
Etapapillomavirus	Eta-1	<i>Fringilla coelebs Papillomavirus</i>
Thetapapillomavirus	Theta-1	<i>Psittacus erithacus Papillomavirus 1</i>
Iotapapillomavirus	Iota-1	<i>Mastomys natalensis Papillomavirus 1</i>
Kappapapillomavirus	Kappa-1	<i>Oryctolagus cuniculus Papillomavirus 1</i>
	Kappa-2	<i>Sylvilagus floridanus Papillomavirus 1</i>
Lambdapapillomavirus	Lambda-1	<i>Felis domesticus Papillomavirus 1</i>
	Lambda-2	<i>Canis familiaris Papillomavirus 1</i>

	Lambda-3	<i>Canis familiaris Papillomavirus 6</i>
	Lambda-4	<i>Procyon lotor Papillomavirus 1</i>
Mupapillomavirus	Mu-1	<i>Human Papillomavirus 1</i>
	Mu-2	<i>Human papillomavirus 63</i>
Nupapillomavirus	Nu-1	<i>Human papillomavirus 41</i>
Xipapillomavirus	Xi-1	<i>Bos taurus Papillomavirus 3</i>
Pipapillomavirus	Pi-1	<i>Mesocricetus auratus Papillomavirus 1</i>
	Pi-2	<i>Micromys minutus Papillomavirus 1</i>
Rhopapillomavirus	Rho-1	<i>Trichechus manatus latirostris Papillomavirus</i>
Sigmapapillomavirus	Sigma-1	<i>Erethizon dorsatum Papillomavirus 1</i>
Taupapillomavirus	Tau-1	<i>Canis familiaris Papillomavirus 2</i>
Upsilonpapillomavirus	Upsilon-1	<i>Tursiops truncatus Papillomavirus 1</i>
	Upsilon-2	<i>Tursiops truncatus Papillomavirus 2</i>
Phipapillomavirus	Phi-1	<i>Capra hircus Papillomavirus 1</i>
Chipapillomavirus	Chi-1	<i>Canis familiaris Papillomavirus 3</i>
	Chi-2	<i>Canis familiaris Papillomavirus 4</i>
Psipapillomavirus	Psi-1	<i>Rousettus aegyptiacus Papillomavirus 1</i>
Omegapapillomavirus	Omega-1	<i>Ursus maritimus Papillomavirus 1</i>
Dyodeltapapillomavirus	Dyodelta-1	<i>Sus scrofa Papillomavirus 1</i>
Dyoepsilonpapillomavirus	Dyoepsilon-1	<i>Francolinus leucoscepus Papillomavirus 1</i>

Dyozetapapillomavirus	Dyozeta-1	<i>Caretta caretta Papillomavirus 1</i>
Dyoetapapillomavirus	Dyoeta-1	<i>Erinaceus europaeus Papillomavirus 1</i>
Dyothetapapillomavirus	Dyotheta-1	<i>Felis domesticus Papillomavirus 2</i>
Dyoiotapapillomavirus	Dyoiota-1	<i>Equus caballus Papillomavirus 2</i>

Fuente: Tabla obtenida de (Bernard et al., 2010)

Anexo C. Tabla de Iniciadores para HPV16

Tabla 13. Iniciadores seleccionados para filogenia molecular de HPV16

CÓDIGO INICIADOR	SECUENCIA	REGIÓN	PRODUCTO	FUENTE
HPV-16-E1-F	AAAGAATTCGCTGATCCTGCAGGTACCAAT	E1		(Siddiqa & Bhatti, 2016)
HPV-16-E1-R	AAAAAGCTTTAATGTGTTAGTATTTTGCCTGACACAC	E1	1950	
HPV16-1258-F	GCGGGTATGGCAATACTGAA	E1		(Bogovac et al., 2011)
HPV-16-1404 R	TAACACCCTCTCCCCCACTT	E1	146-210	
HPV-16-E2 -F	GAATTCGGGGACTCTTTGCCAACGTTTA	E2		(Siddiqa & Bhatti, 2016)
HPV-16-E2-R	CTCGAGTATAGACATAAATCCAGTAGACAC	E2	1098	
HPV-16-E4-F	GGATCCGTATTATCATCTGTGTTTAG	E4		
HPV-16-E4-R	GGGAAGCTTCTATTGTAGTGTTACTA	E4	290	(Jenkins, Allum, Strand, & Aakre, 2013)
HPV_16_E4F	GACTATCCAGCGACCAAGATCAG	E4		
HPV_16_E4R	CTGAGTCTCTGTGCAACAACCTTAGTG	E4	290	

HPV-16-E5-F	AAAGGATCCACAAATCTTGATACTGCATCCACA	E5		
HPV-16-E5-R	AAACTCGAGTGTAATTA AAAAGCGTGCATGAGTATG	E5	252	(Siddiq & Bhatti, 2016)
HPV-16-E6-F	GACATTTTMTGCACCAAAGAGA	E6		
HPV-16-E6-R	GCTTGCAGTACACACATTCTAATA	E6	132	
HPV-16-E6-F	GAATCCATATGCTGTATGTGATAA	E6		(Larsson et al., 2012)
HPV-16-E6-R	CGGTTTGTGTATTGCTGTT	E6	114	
HPV-16-E6 -F	GGGGGATCCGCACCAAAGAGAACTGCAATGTT	E6		
HPV-16-E6-R	GGGCTCGAGCAGCTGGGTTTCTCTACGT	E6	477	(Siddiq & Bhatti, 2016)
G16F-273	GGAATCCATATGCTGTATGTG	E6		
G16R-441	TCAGGACACAGTGGCTTTT	E6	169	(Bogovac et al., 2011)
HPV 16 E6F	AAC TAA GGG CGT AAC CGA AAT C	E6		
HPV 16 E6R	CTCCTCCTCTGAGCTGTCATTT	E6	645	(L. Yang et al., 2014)
16A	TCAAAGCCACTGTGCCTG	E6		
16B	CGTGTCTTGATGATCTGCAA	E6	271	(Carvalho et al., 2010)
HPV 16-U	ATG ACT TTG CTT TTC GGG AT	E6	223	(Gravitt et al., 2003)

HPV 16-I	CTT TGC TTT TCT TCA GGA CA	E6		
HPV-16-E7 -F	GGGGAATTCGCATGGAGATACACCTACATTGC	E7		
HPV-16-E7-R	GGGCTCGAGTGGTTTCTGAGAACAGATGG	E7	297	(Siddiq & Bhatti, 2016)
HPV 16 E7F	ACA GCA ATA CAA CAA ACC GTT G	E7		
HPV 16 E7R	CAT TAC ATC CCG TAC CCT CTT C	E7	544	(L. Yang et al., 2014)
HPV 16 PARK E6 F1	AACCGAAATCGGTTGAACCG	E6/E7		
HPV 16 PARK E6 R1	TGCAGGATCAGCCATGGTAGAT	E6/E7	846	(Park et al., 2016)
HPV-16- E7/6F	TGGGAATCCATATGCTGTATGT	E6/E7		
HPV-16- E7/6R	TCCATGCATGATTACAGCTGGGTT	E6/E7	296	
HPV-16- E7/6F	AAACTAAGGGCGTAACCGAA	E6/E7		(Sun et al., 2011)
HPV-16- E7/6R	CTTCCCCATTGGTACCTGCAG	E6/E7	477	

Anexo D. Tabla de iniciadores para HPV18

Tabla 14. _____ Iniciadores seleccionados para filogenia molecular de HPV18

CÓDIGO INICIADOR	SECUENCIA	REGIÓN	PRODUCTO	FUENTE
18A	TGGTGTATAGAGACAGTATACCCCA	E6	247	(Carvalho et al., 2010)
18B	GCCTCTATAGTGCCCAGGTATGT	E6		
HPV_18_E4F	CCAGACGTCGGCTGCTACA	E4		
HPV_18_E4R	GACAGGTCCACAATGCTGCTT	E4		
PV 18-U	ATG TCA CGA GCA ATT AAG C	E7	137	(Gravitt et al., 2003)
HPV 18-L	TTC TGG CTT CAC ACT TAC AAC A	E7		
HPV 18 LCR 1F	TCGGTTGCCTTTGGCTTAT	LCR		
HPV 18 LCR 1R	TGTCCAACATTCTGTCTACCCTT	LCR		
HPV 18 LCR 2F	GCTAATTGCATACTTGGCTTG	LCR		
HPV 18 LCR 2R	CTACCTGATCTGTTCACGGA	LCR		(Boer et al., 2005)
E6/E7_1F	AATACTATGGCGCGCTTTGA	E6/E7		
E6/E7_1R	CCAGAAACCGTTGAATCCAG	E6/E7		
E6/E 7_2F	ATGGAGACACATTGGAAAACT	E6/E7		

E6/E 7_2R	CAAAATGAAATTCCGGTG	E6/E7	
E6/E 7_3F	TAAGGCAACATTGCAAGACATTG	E6/E7	
E6/E 7_3R	CAATGGCTGATCCAGAAGG	E6/E7	
3SETS_F	AACCGAAAACGGTCGGGAC	E6	
3SETS_R	GCAATACAATGTCTTGCAATGTTG	E6	589
5SETS_F	ACCGAAAACGGTCGGG	E6	
5SETS_R	TCTCCATACACAGAGTCTGAATAATGTC	E6	326
5SETS_F	CATGCTGCATGCCATAAATG	E6	
5SETS_R	GCAATACAATGTCTTGCAATGTTG	E6	342
F	CTAAACCTGCCAAGCGTGTG	LCR	
R	GGAGGCAGTGCCCAAAAGATTA	LCR	457
F	AATCCTCCATTTTGCTGTGC	LCR	
R	CGTGTGGATCCTCAAAGC	LCR	551
F	CTAAACCTGCCAAGCGTGTG	LCR	
R	GCTGTAAGGTGTGCAGTTTTATAACTTG	LCR	325

(A. A. Chen, Gheit,
Franceschi, Tommasino, &
Clifford, 2015)

F	GTGTTTGTGGTATGGGTGTTG	LCR		
R	AAAGCAGTTTTATTACTTAGGGAGTGG	LCR	344	
F	GTCCAGGTGCGCTACAAC	LCR		
R	GTTTCTCACATCTTTTATATACACCG	LCR	327	
L1_18_1F	ATGGCTWTGTGGCGGCCTAG	L1		
L1_18_1R	GAGTCAGAGGTAACAATAGAGC	L1	910	
L1_18_2F	CCAYGGRCTTTAGTACATTGCAAGATA	L1		(Bobek et al., 2010)
L1_18_2R	GTTTAGAAGACGTAGYGGCAGATGG	L1	869	
HPV 18 E6F	AAA AAG GGA GTA ACC GAA AAC G	E6		
HPV 18 E6R	CGC TTA ATT GCT CGT GAC ATA G	E6	657bp	
HPV 18 E7F	CGT TGA ATC CAG CAG AAA AAC T	E7		(L. Yang et al., 2014)
HPV 18 E7R	CAT AAA ACC AGC CGT TAC AAC C	E7	536bp	

Anexo E. Tabla de Iniciadores para HPV58

Tabla 15. Iniciadores seleccionados para filogenia molecular de HPV18

CÓDIGO INICIADOR	SECUENCIA	REGIÓN	PRODUCTO	FUENTE
HPV58 L1 1F	GTGTCATTGGAACCTGGTCCA	L1	985	(Yue et al., 2013)
HPV58 L1 1R	GCCAAGTTTTCCAGCCCTATT	L1	985	
HPV58 L1 2F	GCCAGTGAACCTTATGGGGAT	L1	771	
HPV58 L1 2R	TTTGCGTTTGGTGGATGGT	L1	771	
HPV58 L2 1F	ATGGTGGTATGGTATTGT	L2	810	
HPV58 L2 1R	CTTAACTTGTTGGGTGGT	L2	810	
HPV58 L2 2F	TCCTTTACTGAGCCATCC	L2	1018	
HPV58 L2 2R	ATAAATGCTTGTGCGTGA	L2	1018	
HPV58L11F	TCCATTTATTCCATATCTCCACTA	L1	876	
HPV58 L1 1R	GAAAAAAGAACAACAACTATCCCCA	L1		
HPV58L12F	ATGGTAGATACAGGGTTTGGAT	L1	1044	(Z. Chen et al., 2016)
HPV58 L1 2R	AAACAGGAAACTGACAAAGACA	L1		
HPV58L21F	GTATACTGGTTATGCACATGGT	L2	847	

HPV58 L2 1R	AAAAAAGCAGGGTCAACAAC	L2	
HPV58L22F	AATGGATACCTTTGTTATTTCTAC	L2	
HPV58 L2 2R	TACTTTTTTATTGTTATTGGGACT	L2	992
58E601	TGGAATAACCGTTTTGGGTC	E6/E7	
58E602	TGTAGTAATTAGCTGTGGCCG	E6/E7	788
58E603	CTATAATGCCAAATCTTGTA AAAAC	E6/E7	
58E604	TCCAAGCCTATTTTCATCCTCG	E6/E7	687
58E701	AGACCCCGACGTAGACAAAC	E6/E7	
58E702	CTCCTGTTCTTCGTTCTATTACC	E6/E7	441
58E703	CAAGTGTAACCTGTAACAACGC	E6/E7	
58E704	CTACCTCAAACCAGCCAGTACAG	E6/E7	393
58LCR01	AGTTTCCTTTGGGACGAAAG	LCR	
58LCR02	CACTTTTACAAGACATAGTTTGGC	LCR	727
58LCR03	CCTTAAAGCAAAGCCCAGAC	LCR	
58LCR04	GTAAGTTAAAATATGTGCCTATAAGC	LCR	621

(E. Q. Wu et al., 2009)

58LCR05	CCTTCCTGCACTGCTTTTG	LCR	501
58LCR06	CCTCAGA TCGCTGCAAAGTC	LCR	
58LCR07	GCCTATACTTGCATATGTGACTC	LCR	429
58LCR08	GCACAGA TGTCTCCAACGC	LCR	
58E501	GATGACAAAGGTGACAAAGTAGG	E5	636
58E502	AACA TCAGGTGGGCAGGTG	E5	
58E503	CACTGTAAAATACCACCCACTG	E5	518
58E504	GTTGTGTAGCAGATGCACGC	E5	
58E1 01	CACATGTACCATTGTGTGCC	E1	545
58E1 02	CCACCCCACTAGACTCCGA	E1	
58E1 03	A TCTGCAA TGGA TGACCCTG	E1	472
58E1 04	GTCTGCGTCGCCA TTTTG	E1	
58E1 05	GAA TGCACACACAGAAAACGA	E1	653
58E1 06	TCTATCCATTCTGGTGTGTCC	E1	
58E1 07	AGACAGCGGATATGGCAATAC	E1	561

58E1 08	CTAAACCAATATAAGGCACATGC	E1	
58E1 09	CAATGTTTAACGTGTGACAGAGG	E1	
58E1 10	CTCATTCCAAAATATGATTTCCC	E1	674
58E1 11	TACTATCAATTCCTGAAACATGTATG	E1	
58E1 12	TATTTGCTGGGCCACACAG	E1	552
58E1 13	GGAGGTAATTGGAGACCAATAGT	E1	
58E1 14	CATTATAGCACACTCCATGCG	E1	715
58E1 15	GCATTTTTAGTTGCATTTAAACAG	E1	
58E1 16	TAGGATTTTGCCTGCACTGC	E1	577
58E2 01	GATGCAAATGGTAATCCAGTG	E2	
58E2 02	TCGGTGGTCTTTGGGTCAG	E2	756
58E2 03	TGCAAATTAGGCTTAATAGAGG	E2	
58E2 04	GACTACCCACATGTACCTCCC	E2	611
58E2 05	ATGTACTTTGGTAGCAGGAGAAG	E2	
58E2 06	AGATAGCACCAATGGCCG	E2	786

58E2 07	TGGGGTTGTATTATATACATGGC	E2	668
58E2 08	CACTTAGCAGCACATATTGGC	E2	
58L201	GCACATGGTGGTATGGTATTG	L2	682
58L202	ACTATGTGTGCTAACAGTAGGAGAG	L2	
58L203	ATATTTACTGTTGTGTGTGTTGTTT	L2	631
58L204	AAATATTAAATGTCCAGAGGCC	L2	
58L205	CCCA TCAA TTCCCACTCC	L2	767
58L206	AATCATGTATAGTATCAGCATCGTC	L2	
58L207	CACCTGCAATACTTAATGTTTCC	L2	675
58L208	AAAGTCCATCATTAACTATAGGG	L2	
58L209	AAGTCCCATACAGCCTGTCC	L2	594
58L210	TTTTATTGTTATTGGGACTTTTG	L2	
58L211	GGAACAGGTACAACAGCAGC	L2	554
58L212	TTTGATGGAAAAATATGGATTG	L2	
58L101	CCTCTGCACTCACATACGTCC	L1	808

58L102	AGCTGCATTATTGTTACAGGC	L1	
58L103	CTTGTGTCA TTGGAACCTGG	L1	683
58L104	CAGTGGGAGGTTTACAGCC	L1	
58L105	GAAACCAGTAACAGATATCCCG	L1	712
58L106	CTTCAACATGACGTACATATTCC	L1	
58L107	AACAGGGAATGCTTATCTATGG	L1	627
58L108	ACCTTCCTTAGTTACTTCAGTGC	L1	
58L109	AGCGTGCACAAGGTCATAAC	L1	696
58L110	GGAAACTGACAAGGACATAGAAC	L1	
58L111	CAGTTATTTGTTACCGTGGTTG	L1	603
58L112	CAACATATACACAAACATAAAACAAAC	L1	
HPV58-E2-out-1	TGATGCAAATGGTAATCCAG	E2	1356
HPV58-E2-out-2	AACACCAGCAACCAAGCATA	E6/E7	
HPV58-E2-in-3	TGCAAATGGTAATCCAGTGT	E6/E7	1330
HPV58-E2-in-4	AGAAATAGATAGCACCAATGGC	E6/E7	

(Bae et al., 2009)

HPV58E6-out-1	CGAAAACGGTCTGACCGAAA	E6/E7	968
HPV58E7-out-2	TATCGTCTGCTGTTTCGTCC	E6/E7	
HPV58E6-in-3	GACCGAAACCGGTGCATATA	E6/E7	901
HPV58E7-in-4	ACCGCTTCTACCTCAAACCA	E6/E7	
HPV58L1-outer-1	CCTCTTGTGTCATTGGAACC	L1	1921
HPV58L1-outer-2	TAGGGCAATTTAGGGACAGC	L1	
HPV58L1-inner-3	GGTCCAGACATTGCATCTTC	L1	1809
HPV58L1-inner-4	AGAAACAGGAAACTGACAAGGAC	L1	

	G16R-441	0	0	0		0	0		-2	0	0	0	0
	HPV 16 E6F	0	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPV 16 E6R	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	16A	0	0	0	-1	0	0	0	-2	-4	-2	0	0
	16B	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	HPV 16-U	0	0	0	0	-3	0	0	0	0	0	0	0
	HPV 16-I	0	0	-5		-3	0		0	0	0	0	0
E7	HPV-16-E7 -F	-5	0	-4	0	0	0	0	-2	-4	0	-4	0
	HPV-16-E7- R	-5	0	-4		0	0		0	-4	0	0	0
	HPV 16 E7F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPV 16 E7R	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
E6/E7	HPV 16 PARK E6 F1	0	-5	0	-3	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPV 16 PARK E6 R1	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	HPV-16-E7/6F	0	0	0	-5	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPV-16-E7/6R	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	HPV-16-E7/6F	0	0	0	-3	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPV-16-E7/6R	-5	0	0		0	0		0	0	0	0	0
L1	HPV 16	0	0	0	-5	-3	0	-4	0	0	0	0	0
		0	0	-5		-5	0		-2	-4	0	-4	0
	HPV-16-L1 -F	0	0	0	-3	-3	0	0	0	-4	0	0	0

	HPV-16-L1- R	0	0	-3		0	0		0	-4	0	0	0
	HPV 16 PARK L1 F1	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPV 16 PARK L1 R1	0	-4	0		0	0		0	0	0	0	0
	L1_16_1F	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
	L1_16_1R	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	L1_16_2F	0	0	0	0	-3	0	0	0	0	0	0	0
	L1_16_2R	0	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	L1-F	0	0	0	-3	-3	0	-4	0	0	0	0	0
	L1-642R	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	L1-482F	0	0	0	-1	0	0	-4	-2	0	0	0	0
	L1-1191R	0	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	L1-1023F	0	0	0	-3	0	0	0	0	0	0	0	0
	L1-R	0	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	HPV16 L1 1F	0	0	-5	-1	0	0	0	-2	0	-2	0	0
	HPV16 L1 1R	0	0	-5		0	0		-2	0	-2	0	0
	HPV16 L1 2F	0	0	0	-5	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPV16 L1 2R	0	0	-5		0	0		0	0	0	0	0
L2	HPV-16-L2-F	-5	-4	0	-2	-3	0	0	-2	-4	0	-4	0
	HPV-16-L2-R	-5	-4	-3		0	0		0	-4	0	-4	0
	HPV16 L2 1F	0	0	-5	-1	-3	0	0	0	0	0	0	0
	HPV16 L2 1R	0	0	-5		-3	0		0	0	0	0	0

		HPV16 L2 2F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		HPV16 L2 2R	0	0	0		0	0		0	0	0	0
LCR		N-LCR16-F	0	0	0	-1	-3	0	0	0	0	0	0
		N-LCR16-R	0	-4	0		-3	0		0	0	0	0
		HPV 16 PARK LCR F1	0	-5	0	-4	0	0	0	0	0	0	0
		HPV 16 PARK LCR R1	-5	0	0		0	0		0	0	0	0
		LCR 1F	0	0	0	-4	0	0	0	0	0	0	0
		LCR 1R	0	0	-3		0	0		0	0	0	0
		LCR 2F	-5	-4	0	0	-3	0	0	0	0	0	0
		LCR 2R	0	0	0		-3	0		0	0	0	0
HPV-18	E6	18 ^a	-5	-5	0	-1	0	0	0	0	0	0	-5
		18B	0	0	0		0	0		-2	0	0	-4
	E4	HPV_18_E4F	0	0	0	-1	-3	0	0	-2	0	0	0
		HPV_18_E4R	0	0	0		0	0		0	0	0	0
	E7	PV 18-U	0	0	-5	-3	0	0	0	-2	0	0	0
		HPV 18-L	0	0	0		0	0		0	0	0	0
LCR		HPV 18 LCR 1F	0	0	0	-1	0	0	-4	-2	0	0	0
		HPV 18 LCR 1R	0	0	0		0	0		0	0	0	0
		HPV 18 LCR 2F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		HPV 18 LCR 2R	0	0	0		0	0		-2	0	-3	-4
E6/E7		E6/E7_1F	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0

	E6/E7_1R	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	E6/E 7_2F	0	0	0	-5	-3	0	-4	0	0	0	0	0
	E6/E 7_2R	-5	0	-5		-3	0		-2	-4	-2	0	0
	E6/E 7_3F	0	-4	0	-3	-3	0	-4	0	0	0	0	0
	E6/E 7_3R	0	0	0		0	0		-2	0	0	0	0
E6	3SETS_F	0	-4	0	0	0	0	-4	-2	0	0	0	0
	3SETS_R	-5	-4	0		-3	0		0	0	0	0	0
	5SETS_F	0	-4	-5	-5	-3	0	-4	-2	0	-3	0	-5
	5SETS_R	0	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	5SETS_F	-5	-5	0	-1	0	0	-4	0	0	0	0	0
	5SETS_R	-5	-4	0		-3	0		0	0	0	0	0
LCR	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	0	-4	0		0	0		-2	-4	-2	0	0
	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	R	0	0	0		0	0		-2	0	0	0	0
	F	0	0	0	-2	0	0	-4	0	0	0	0	0
	R	-5	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	F	0	0	-5	-5	0	0	-4	0	0	0	0	0
	R	0	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	F	0	0	0	-1	-3	0	-4	-2	0	-2	0	0
	R	-5	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
L1	L1_18_1F	0	0	0	-5	0	-1	0	-2	0	0	-4	0
	L1_18_1R	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0

	58E602	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	58E603	0	0	-5	-3	-5	0	-4	0	0	0	0	0
	58E604	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
E7	58E701	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	58E702	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	58E703	-5	0	0	-3	0	0	0	0	0	0	0	0
	58E704	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
LCR	58LCR01	0	-4	0	-1	0	0	-4	0	0	0	0	0
	58LCR02	0	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	58LCR03	0	0	0	0	0	0	-4	0	0	0	0	0
	58LCR04	-5	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	58LCR05	0	0	0	-2	0	0	0	-2	0	0	0	0
	58LCR06	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	58LCR07	0	0	0	0	0	0	-4	0	0	0	0	0
	58LCR08	0	0	0		0	0		-2	0	0	0	0
E5	58E501	0	0	0	0	0	0	-4	0	0	0	0	0
	58E502	0	0	0		0	0		-2	0	0	0	0
	58E503	0	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	0	0
	58E504	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
E1	58E1 01	0	-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	58E1 02	0	0	0		-3	0		-2	0	0	0	0
	58E1 03	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	58E1 04	0	0	0		0	0		-2	0	-2	0	0

	58E1 05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	58E1 06	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	58E1 07	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
	58E1 08	0	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	58E1 09	-5	0	0	-4	0	0	0	0	0	0	0	0
	58E1 10	0	-4	-5		-3	0		0	0	0	0	0
	58E1 11	0	0	0	0	-3	0	-4	0	0	0	0	0
	58E1 12	0	0	0		0	0		-2	0	0	0	0
	58E1 13	-4	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
	58E1 14	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	58E1 15	-5	-4	0	-2	-5	0	0	0	0	0	0	0
	58E1 16	0	-4	0		0	0		0	0	0	0	0
E2	58E2 01	0	0	-5	-2	0	0	0	0	0	0	0	0
	58E2 02	0	0	0		0	0		-2	0	0	0	0
	58E2 03	-5	0	0	0	-3	0	0	0	0	0	0	0
	58E2 04	-5	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	58E2 05	0	0	0	-2	0	0	-4	0	0	0	0	0
	58E2 06	0	0	0		0	0		-2	0	-2	0	0
	58E2 07	-5	0	0	-3	-3	0	0	0	0	0	0	0
	58E2 08	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
L2	58L201	0	0	0	-5	0	0	-4	0	0	0	0	0
	58L202	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	58L203	0	0	0	-1	-5	0	0	0	0	0	0	0

	58L204	0	0	-5		-3	0		0	0	0	0	0
	58L205	0	0	-5	-5	0	0	-4	-2	0	-2	0	0
	58L206	0	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	58L207	0	0	0	0	-3	0	0	0	0	0	0	0
	58L208	-5	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	58L209	0	0	0	-5	0	0	0	0	0	0	0	0
	58L210	0	0	-5		-5	0		0	0	0	0	0
	58L211	0	0	0	-5	0	0	0	0	0	0	0	0
	58L212	0	0	-5		-5	0		0	0	0	0	0
L1	58L101	0	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	0	0
	58L102	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	58L103	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	58L104	0	0	0		0	0		-2	0	0	0	0
	58L105	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	58L106	-5	0	0		-3	0		0	0	0	0	0
	58L107	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
	58L108	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	58L109	0	0	0	-1	0	0	0	0	0	0	0	0
	58L110	0	0	0		0	0		0	0	0	0	0
	58L111	0	0	0	-1	0	0	-4	0	0	0	0	0
	58L112	0	0	-5		-5	0		0	0	0	0	0
E2	HPV58-E2-out-1	0	0	-5	-3	-3	0	0	0	0	0	0	0

	HPV58-E2-out-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPV58-E2-in-3	0	0	-5	-3	-3	0	0	0	0	0	0
	HPV58-E2-in-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
E6/E7	HPV58E6-out-1	0	0	0	0	-5	0	0	0	0	0	0
	HPV58E7-out-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPV58E6-in-3	0	-4	0	-1	0	0	0	0	0	0	0
	HPV58E7-in-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
L1	HPV58L1-outer-1	0	0	-5	-1	0	0	0	0	0	0	0
	HPV58L1-outer-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	HPV58L1-inner-3	0	0	0	-2	0	0	0	0	0	0	0
	HPV58L1-inner-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Donde:

X1: Formación de Dímeros (nt)

X3: Temperatura melting (Tm)

X5: %GC

X7: Diferencia de longitud (nt)

X9: Cobertura (%)

X11: Identidad (%)

X2: Formación de Horquilla (nt)

X4: Diferencia de Tm (°C)

X6: Degeneración (nt)

X8: Puntuación Máxima

X10: E-value

X12: Homología con no HPV

Anexo G. Score Ridit para cada iniciador.

Iniciadores	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
HPV-16-E1-F	0,8446	-0,1262	0,9612	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	0,9029	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E1-R	0,8446	0,8932	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	0,9029	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV16-1258-F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-1404 R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E2 -F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	0,9029	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E2- R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	0,9029	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E4-F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	0,7961	0,9029	0,9853	-0,0631	0,9806
HPV-16-E4-R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	0,7961	0,9029	0,9853	-0,0631	0,9806
HPV_16_E4F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV_16_E4R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E5-F	0,8446	0,8932	0,9612	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,8738	0,7961	0,9029	-0,0838	0,9369	-0,0194
HPV-16-E5-R	0,8446	0,8932	0,9612	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,8738	0,7961	0,9029	-0,0838	0,9369	-0,0194
HPV-16-E6-F	-0,1407	0,8932	-0,2184	-0,4078	0,7073	0,9806	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	0,9369	-0,0194
HPV-16-E6-R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E6-F	-0,1407	0,8932	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E6-R	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E6 -F	0,8446	-0,1262	0,8204	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	0,7961	0,9029	-0,0838	0,9369	-0,0194
HPV-16-E6- R	0,8446	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	0,7961	0,9029	-0,0838	-0,0631	-0,0194
G16F-273	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
G16R-441	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194

HPV 16 E6F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16 E6R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
16A	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	0,9029	0,9311	-0,0631	-0,0194
16B	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16-U	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16-I	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E7 -F	0,8446	-0,1262	0,9612	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,8738	0,7961	0,9029	-0,0838	0,9369	-0,0194
HPV-16-E7- R	0,8446	-0,1262	0,9612	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	0,9029	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16 E7F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16 E7R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16 E6 F1	-0,1407	0,9806	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16 E6 R1	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E7/6F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E7/6R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E7/6F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-E7/6R	0,8446	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,8835	0,9415	-0,0194	0,7573	0,7961	0,9029	-0,0838	0,9369	-0,0194
HPV-16-L1 -F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	0,7073	-0,0194	0,8738	-0,2039	0,9029	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-L1- R	-0,1407	-0,1262	0,9612	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	0,9029	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16 L1 F1	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16 L1 R1	-0,1407	0,8932	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1_16_1F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194

L1_16_1R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1_16_2F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1_16_2R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1-F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1-642R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1-482F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1-1191R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1-1023F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1-R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	0,7073	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV16 L1 1F	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	-0,0194
HPV16 L1 1R	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	-0,0194
HPV16 L1 2F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV16 L1 2R	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,8835	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV-16-L2-F	0,8446	0,8932	-0,2184	0,7087	0,7073	-0,0194	-0,3689	0,7961	0,9029	-0,0838	0,9369	-0,0194
HPV-16-L2-R	0,8446	0,8932	0,9612	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	0,9029	-0,0838	0,9369	-0,0194
HPV16 L2 1F	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV16 L2 1R	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV16 L2 2F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV16 L2 2R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
N-LCR16-F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
N-LCR16-R	-0,1407	0,8932	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16 LCR F1	-0,1407	0,9806	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 16 LCR R1	0,8446	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194

LCR 1F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
LCR 1R	-0,1407	-0,1262	0,9612	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
LCR 2F	0,8446	0,8932	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
LCR 2R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
18A	0,8446	0,9806	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	0,9806
18B	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	-0,0838	0,9369	-0,0194
HPV_18_E4F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV_18_E4R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
PV 18-U	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,8738	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 18-L	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 18 LCR 1F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 18 LCR 1R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 18 LCR 2F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 18 LCR 2R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	0,9311	0,9369	-0,0194
E6/E7_1F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
E6/E7_1R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
E6/E 7_2F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
E6/E 7_2R	0,8446	-0,1262	0,8204	0,8835	0,7073	-0,0194	0,7573	0,7961	0,9029	0,9311	-0,0631	-0,0194
E6/E 7_3F	-0,1407	0,8932	-0,2184	0,7087	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
E6/E 7_3R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
3SETS_F	-0,1407	0,8932	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
3SETS_R	0,8446	0,8932	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
5SETS_F	-0,1407	0,8932	0,8204	0,8835	0,7073	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	0,9806

5SETS_R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
5SETS_F	0,8446	0,9806	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
5SETS_R	0,8446	0,8932	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
R	-0,1407	0,8932	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	0,9029	0,9311	-0,0631	-0,0194
F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
R	0,8446	-0,1262	-0,2184	0,7087	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
F	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,8835	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	-0,0194
R	0,8446	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1_18_1F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	-0,3512	0,9806	-0,3689	0,7961	-0,0971	-0,0838	0,9369	-0,0194
L1_18_1R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
L1_18_2F	0,8446	-0,1262	0,8204	0,8835	0,9415	0,9806	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	0,9369	-0,0194
L1_18_2R	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,8835	0,9415	0,9806	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	0,9369	-0,0194
HPV 18 E6F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 18 E6R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 18 E7F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV 18 E7R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58 L1 1F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58 L1 1R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194

HPV58 L1 2F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58 L1 2R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58 L2 1F	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,7087	0,7073	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	-0,0194
HPV58 L2 1R	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	-0,0194
HPV58 L2 2F	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	-0,0194
HPV58 L2 2R	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	-0,0194
HPV58L11F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58 L1 1R	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58L12F	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58 L1 2R	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58L21F	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58 L2 1R	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	0,9853	-0,0631	-0,0194
HPV58L22F	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,9415	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58 L2 2R	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,9415	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E601	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E602	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E603	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,7087	0,9415	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E604	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E701	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E702	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E703	0,8446	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E704	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58LCR01	-0,1407	0,8932	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194

58LCR02	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58LCR03	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58LCR04	0,8446	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58LCR05	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58LCR06	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58LCR07	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58LCR08	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E501	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E502	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E503	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E504	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 01	-0,1407	0,8932	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 02	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 03	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 04	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	-0,0194
58E1 05	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 06	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 07	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 08	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 09	0,8446	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 10	-0,1407	0,8932	0,8204	0,7087	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 11	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 12	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194

58E1 13	0,995	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 14	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 15	0,8446	0,8932	-0,2184	0,7087	0,9415	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E1 16	-0,1407	0,8932	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E2 01	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E2 02	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E2 03	0,8446	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E2 04	0,8446	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E2 05	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E2 06	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	-0,0194
58E2 07	0,8446	-0,1262	-0,2184	0,7087	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58E2 08	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L201	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L202	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L203	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,9415	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L204	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,7073	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L205	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,8835	-0,3512	-0,0194	0,7573	0,7961	-0,0971	0,9311	-0,0631	-0,0194
58L206	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	0,7073	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L207	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L208	0,8446	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L209	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L210	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,8835	0,9415	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L211	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,8835	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194

58L212	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,8835	0,9415	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L101	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L102	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L103	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L104	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	0,7961	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L105	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L106	0,8446	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L107	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L108	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L109	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L110	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L111	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
58L112	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	0,9415	-0,0194	0,7573	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58-E2ou-1	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,7087	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58-E2out2	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58-E2-in-3	-0,1407	-0,1262	0,8204	0,7087	0,7073	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58-E2-in-4	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58E6-out-1	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	0,9415	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58E7-out-2	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58E6-in-3	-0,1407	0,8932	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58E7-in-4	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58L1oute-1	-0,1407	-0,1262	0,8204	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58L1oute-2	-0,1407	-0,1262	-0,2184	-0,4078	-0,3512	-0,0194	-0,3689	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194

HPV58L1inner3	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194
HPV58L1inne-4	-0,1407	-0,1262	-0,2184	0,7087	-0,3512	-0,0194	0,8738	-0,2039	-0,0971	-0,0838	-0,0631	-0,0194

Donde:

X1: Formación de Dímeros (nt)

X3: Temperatura melting (Tm)

X5: %GC

X7: Diferencia de longitud (nt)

X9: Cobertura (%)

X11: Identidad (%)

X2: Formación de Horquilla (nt)

X4: Diferencia de Tm (°C)

X6: Degeneración (nt)

X8: Puntuación Máxima

X10: E-value

X12: Homología con no HPV

Anexo H. Matriz de Correlaciones ^{a*b}

Tabla 16. Tabla de correlaciones entre las nuevas variables

Correlaciones	y1	y2	y3	y4	y5	y6	y7	y8	y9	y10	y11	y12
y1	1	0,409	-0,018	-0,318	0,231	-0,133	0,074	-0,245	0,406	-0,407	0,264	-0,183
y2	0,409	1	-0,299	-0,31	0,108	-0,135	0,031	-0,237	0,04	-0,328	0,052	0,093
y3	-0,018	-0,299	1	-0,062	0,304	0,049	-0,073	0,134	0,281	0,253	0,249	-0,184
y4	-0,318	-0,31	-0,062	1	-0,221	0,166	0,124	-0,341	-0,363	-0,288	-0,252	-0,455
y5	0,231	0,108	0,304	-0,221	1	0,147	0,089	-0,275	0,014	-0,132	-0,03	0,042
y6	-0,133	-0,135	0,049	0,166	0,147	1	-0,5	-0,283	-0,394	-0,285	0,51	-0,387
y7	0,074	0,031	-0,073	0,124	0,089	-0,5	1	-0,108	0,065	-0,333	-0,299	-0,406
y8	-0,245	-0,237	0,134	-0,341	-0,275	-0,283	-0,108	1	0,352	0,783	0,256	0,35
y9	0,406	0,04	0,281	-0,363	0,014	-0,394	0,065	0,352	1	0,147	0,421	0,064
y10	-0,407	-0,328	0,253	-0,288	-0,132	-0,285	-0,333	0,783	0,147	1	-0,09	0,576
y11	0,264	0,052	0,249	-0,252	-0,03	0,51	-0,299	0,256	0,421	-0,09	1	-0,333
y12	-0,183	0,093	-0,184	-0,455	0,042	-0,387	-0,406	0,35	0,064	0,576	-0,333	1

a Determinante = ,000

b Esta matriz no es cierta positiva.