

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACION DE LOS DIFERENTES TIPOS
DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO
(HPVs 6, 11, 16 Y 18) Y EXPRESION DE
ONCOGENES EN LESIONES BENIGNAS Y
PRECANCEROSAS DE LA REGION
GENITAL EN UNA MUESTRA DE
LA POBLACION MEXICANA

T E S I S
QUE PARA OPTAR POR EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A N
RAFAEL CAMACHO CARRANZA
TANIA CARREON VALENCIA

Abril de 1988



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

página

1) RESUMEN	1
2) INTRODUCCION	4
2.1) Origen y evolución del cáncer humano	4
2.2) Desarrollo del cáncer cervicec-uterino	10
3) ASPECTOS PARTICULARES	18
3.1) Aspectos epidemiológicos	18
3.2) Etiología de la enfermedad	20
3.3) Aspectos moleculares	27
3.3.1) Clasificación del virus del papiloma	28
3.3.2) Estructura del genoma del virus del papiloma	31
3.3.3) Interacción virus-hospedero	35
3.3.4) Estructura del oncogen <i>gyc</i>	38
4) OBJETIVOS	40
5) MATERIAL Y METODOS	42
5.1) Obtención de biopsias	42
5.2) Transformación bacteriana	42
5.2.1) Medio de cultivo	43

5.2.2) Preparación de células competentes	45
5.2.3) Transformación	46
5.3) Purificación de plásmidos a gran escala	47
5.3.1) Crecimiento de bacterias y amplificación de plásmidos	47
5.3.2) Extracción de plásmidos	48
5.3.3) Gradiente de cloruro de cesio	49
5.4) Extracción de ácidos nucleicos de condilomas	50
5.4.1) Purificación de ácidos nucleicos de las células de los pacientes	50
5.4.2) Separación de RNA y DNA	51
5.5) Cuantificación de ácidos nucleicos	51
5.6) Electroforesis de ácidos nucleicos	52
5.7) Desinserción de las sondas a partir del vector	52
5.8) Digestión con endonucleasas de restricción	53
5.9) Hibridación en punto y Southern	54
5.9.1) Hibridación en punto	54
5.9.2) Hibridación tipo Southern	55
5.9.3) Marcaje de las sondas	55
5.9.4) Condiciones de hibridación	56
5.9.5) Detección del DNA biotinilado en nitrocelulosa	58
5.9.6) Síntesis del polímero de biotina-fosfatasa alcalina	59
5.9.7) Autorradiografía	59
6) RESULTADOS	61
6.1) Hibridación en punto con HPVs 6, 11, 16 y 18	61
6.1.1) Hibridación para DNA	61
6.1.2) Hibridación para RNA	69

6.2) Hibridación tipo Southern con HPVs 6, 11, 16 y 18	71
6.2.1) Southern de filtros con muestras ensayadas por hibridación en punto	72
6.2.2) Southern con muestras no probadas por hibridación en punto	74
6.3) Hibridación tipo Southern con el oncogen <i>MYC</i>	76
6.4) Hibridación cruzada con HPVs 6, 11, 16 y 18	76
7) DISCUSION	78
8) APENDICES	86
8.1) Cálculo del T_m	86
8.2) Cálculo del $Cot\ 1/2$	87
9) BIBLIOGRAFIA	89

1) RESUMEN

El cáncer de cuello uterino (CaCu), debido a su alta incidencia, constituye un problema de salud pública; además de ocupar el segundo lugar en frecuencia de los cánceres que padece la mujer mexicana.

Actualmente se considera que el CaCu evoluciona a partir de lesiones precancerosas -neoplasia intraepitelial cervical (NIC)- de las células epiteliales del cuello uterino, y éstas a su vez del condiloma plano atípico, que en conjunto se consideran una misma enfermedad que se presenta como una secuencia de cambios morfológicos con diversos estadios. Todas estas lesiones se presentan en mujeres que han tenido múltiples parejas sexuales y han iniciado a temprana edad la vida sexual. Esto sugiere claramente que algún agente infeccioso está involucrado en la etiología de la enfermedad. Múltiples estudios han encontrado fuertes evidencias a favor del virus del papiloma humano (HPV) como agente causal. Actualmente se conocen unos 42 tipos diferentes de HPV de acuerdo a su secuencia de nucleótidos, y principalmente cuatro se han encontrado asociados a los tumores de la región genital. Los tipos 6 y 11 han sido encontrados en los tumores benignos (condilomas acuminado y plano, NIC I y NIC II), con su DNA en estado episomal o no integrado al genoma del huésped; mientras que los tipos 16 y 18 en las lesiones más

avanzadas (condiloma plano atípico, NIC III y CaCu), generalmente con su DNA integrado al de su hospedero. Actualmente existe controversia sobre el porcentaje de condilomas planos que evolucionan a NIC y CaCu; aunque en algunos estudios prospectivos se ha encontrado que las lesiones que presentan los tipos 16 y 18 son las que más frecuentemente progresan a malignidad.

Por otra parte, en países desarrollados se han encontrado variaciones en los tipos virales presentes en diferentes regiones geográficas del mundo, por lo que no es posible extrapolar estos hallazgos tan fácilmente a la población mexicana, que presenta características socioculturales diferentes. En este estudio, se determinó la incidencia de los tipos 6, 11, 16 y 18 del virus del papiloma humano en lesiones benignas y precancerosas de la región genital, en pacientes de dos instituciones hospitalarias de la Ciudad de México.

Para lograr lo anterior, se realizaron ensayos de hibridación en punto con el DNA de 58 muestras, utilizando sondas marcadas con biotina o con α - ^{32}P dATP. Para determinar la expresión del virus, se llevaron a cabo ensayos de hibridación en punto, utilizando el RNA extraído de estas muestras. Asimismo, se realizaron ensayos de hibridación tipo Southern para determinar el estado físico del DNA viral en la célula huésped.

Estudios previos han demostrado que el oncogen c-myc se encuentra amplificado en estados avanzados de la enfermedad, siendo de esperarse no detectar esta amplificación en lesiones

previas. Así, se realizaron estudios para determinar la posible activación de este oncogen utilizando su DNA como sonda.

Los resultados encontrados demuestran una predominancia de HPV 6, seguido de HPV 11 y 18, en las muestras estudiadas. Las incidencias encontradas para los dos primeros tipos concuerdan con lo reportado para otros países, mientras que el último presenta una frecuencia elevada, sobre todo en los casos de hombres. Asimismo, en estos últimos se encontró una mayor frecuencia de infección múltiple. La presencia de estos tipos virales coincide con la detección de actividad viral en la mayoría de los casos estudiados.

Las muestras ensayadas por Southern demuestran la presencia del DNA viral en un estado físico no integrado, lo que concuerda con lo reportado para este tipo de lesiones. Además, se encontraron modificaciones en la secuencia de nucleótidos del DNA de los virus encontrados, como lo demuestra la pérdida de sitios de restricción. Por otra parte, no se encontró amplificación del oncogen c-myc, detectable por el ensayo utilizado.

Finalmente, se discuten las implicaciones del empleo de esta técnica, en la detección temprana del CaCu.

2) INTRODUCCION.

2.1) Origen y evolución del cáncer humano.

De acuerdo con Willis (1948), un tumor se puede definir como una masa anormal de tejido con un crecimiento excesivo y poco coordinado, y que permanece de esta manera, aún después de cesar el estímulo que provocó el cambio. Sin embargo, estudios posteriores han permitido probar que el cáncer, más que un fenómeno de desorganización, en realidad constituye un proceso con alto grado de coordinación en el que las células adquieren una serie de capacidades diferentes a las de las células normales (Rensberger 1984).

Los primeros estudios sobre cáncer se realizaron durante el siglo XIX, en que un grupo de investigadores observó que el cáncer humano parecía asociado a la exposición ocupacional a compuestos químicos. Estudios realizados a principios de este siglo permitieron la identificación de algunos compuestos carcinogénicos. Sin embargo, la naturaleza del cáncer humano se comenzó a comprender hasta los años 20s al inducir tumores por compuestos químicos, en la piel de roedores (Pitot 1982). Estos estudios permitieron comprender que el cáncer es un proceso multifactorial, basado en la emergencia sucesiva de varias subclonas que sustituyen a su predecesora (Klein y Klein 1988).

Así, generalmente se reconocen tres etapas en el desarrollo de la enfermedad: iniciación, promoción y progresión, a las que nos referiremos a continuación.

La iniciación es una etapa en que un agente produce daño directo al DNA y predispone a la célula a una transformación neoplásica (Rensberger 1984). Se considera que ésta es una etapa irreversible (Pitot 1982). En este estado inicial, las células son probablemente aún sensibles a las señales hormonales de diferenciación, por lo que pueden no desarrollar el carácter tumoral (Rensberger 1984).

En la segunda etapa, que es la de promoción, otro agente provoca un daño tal al DNA, que permite la manifestación del efecto iniciador, con la consecuente diferenciación celular (Hanaia et al. 1985). Esta etapa, que es esencialmente reversible se considera afectada por la dieta, hormonas y otros factores ambientales (Pitot 1982).

La tercera etapa es la denominada por Foulds (1969) como progresión. En ésta, algunas células tumorales se internan en los vasos sanguíneos o linfáticos, transportándose a otros tejidos; esto provoca el desarrollo tumoral en ellos (metástasis) y usualmente la muerte del individuo (Nicolson 1982).

La existencia de pasos en la evolución del cáncer, ha sido confirmada por análisis estadísticos de curvas edad-incidencia,

que sugieren la existencia de cambios sucesivos de tipo mutacional en diferentes tipos de cáncer (Klein y Klein 1985). Además, ciertos fenómenos han sido consistentemente observados, como son: propensión de ciertos individuos a desarrollar cáncer que se manifiesta como una característica mendeliana (Bishop 1987); asimismo se ha observado daño cromosómico en células cancerosas (Rowley 1984), correlación entre la deficiencia en los mecanismos de reparación del DNA y la propensión al cáncer (Hanawalt y Sarasin 1986) y la relación entre sustancias químicas capaces de inferir daño mutagénico con su potencial carcinogénico (Ames 1979). Sin embargo no todos los cánceres son producidos por compuestos químicos, algunos son el resultado de exposición a radiaciones (Kohn y Fry 1984); también se piensa que algunos tipos de cáncer se originan por rearrreglos de los genes en los cromosomas (translocaciones) (Yunis y Soreng 1984); asimismo existen evidencias del papel de los virus como causa del cáncer humano (Aaronson 1983).

Todas estas observaciones sugieren una alteración a nivel genético, que daría como resultado una pérdida en las señales de regulación de la división y diferenciación celular. Sin embargo, fue hasta el descubrimiento de los oncogenes que fue posible unificar estas observaciones, en una teoría capaz de explicar un mecanismo molecular para el origen del cáncer y su comportamiento genético.

Se considera que el desarrollo de un cáncer es el resultado

de una activación anormal de proto-oncogenes, que son genes celulares potencialmente transformantes (Willecke y Schafer 1984). Durante el desarrollo normal de una célula, los proto-oncogenes desempeñan papeles clave en su regulación (Kelly 1986). Durante las diferentes etapas del desarrollo de un cáncer, pueden ocurrir alteraciones en varios proto-oncogenes, cuya combinación da como resultado un fenotipo maligno (Bishop 1983a).

El descubrimiento y conocimiento del ciclo de vida de los retrovirus ha permitido identificar a los genes celulares que participan en la transformación neoplásica. El RNA de una sola hebra del genoma viral, se transcribe en DNA por la enzima reverso-transcriptasa. El DNA viral se integra en el DNA cromosomal y la célula huésped utiliza su propia maquinaria para expresar los genes virales (Bishop 1983b). Aquí, pueden presentarse dos posibilidades. En primer lugar, dado que la integración del DNA viral es potencialmente mutagénica, puede haber daño directo a los genes celulares, lo que influye sobre su expresión, llevándolos a ser regulados por los elementos regulatorios del genoma viral. La otra posibilidad es que la recombinación entre los genomas retroviral y celular, implanten genes de este último en el primero, y esta nueva combinación sea oncogénica (Bishop 1987). Además, ambos fenómenos han sido observados también de manera conjunta (Miles y Robinson 1985).

Actualmente se conocen al menos 19 diferentes oncogenes retrovirales (tabla I), de los cuales, diez tienen contrapartida

celular (v-abl, v-erbA, v-src, v-fos, v-mos, v-myb, v-myc, v-Ha-cas, v-Ki-cas y v-sis) y que han sido involucrados en neoplasias (Willecke y Schafer 1984).

Existen varias formas demostradas de activar oncogenes y todas ellas asociadas a modificación genética. Estas se pueden resumir en: mutaciones puntuales (Tabin et al. 1982); unión de promotores fuertes o de "enhancers" a los proto-oncogenes (Blair et al. 1981; Chang et al. 1982); rearrreglos de proto-oncogenes en el genoma (Cooper et al. 1980); translocaciones cromosómicas (Yunis y Soreng 1984; Abe et al. 1986); y amplificación de oncogenes (Collins y Groudine 1983; Alitalo et al. 1983).

De los diez oncogenes celulares con contrapartida viral, seis se activan mediante inserciones (c-erbA, c-erbB, c-myc, c-mos, c-myb, c-Ha-cas), y cuatro mediante traslocaciones (c-abl, c-myb, c-myc y c-sis). Además, varios proto-oncogenes son amplificados con su consecuente conversión a oncogene (Bishop 1987).

Se ha demostrado que existen varios mecanismos bioquímicos por los cuales pueden actuar los productos oncogénicos, y son: fosforilación de proteínas, siendo sus sustratos los aminoácidos tirosina, serina o treonina (Bishop 1987); regulación metabólica por proteínas que unen guanosina 5'-trifosfato (GTP) (Hurley et al. 1984); control de la expresión génica al influir en la transcripción de mRNA (Kingston et al. 1985); y participación en la replicación del DNA (Strudznski et al. 1986).

Tabla I. Oncogenes retrovirales y su proto-oncogen humano correspondiente

Oncogen retroviral	Tumor de origen	Especie de origen	Localización cromosómica del proto-oncogen
v-src	Sarcoma de Rous	Pollo	20
v-fps	Sarcoma de Fujinami	Pollo	
v-fes	Sarcoma felino de Snyder-Theilen	Gato	15q25-q25
v-yes	Sarcoma de Yamaguchi	Pollo	
v-ros	Sarcoma 2 de Rochester	Pollo	
v-myc	Mielocitomatosis, cepa MC29	Pollo	8q24
v-erbA	Eritroblastosis de ave	Pollo	17
v-erbB	Eritroblastosis de ave	Pollo	
v-myb	Mieloblastosis de ave	Pollo	6q22-q24
v-rel	Reticoendoteliosis, cepa T	Pavo	
v-mos	Sarcoma de Moloney	Ratón	8q22
v-abl	Leucemia de Abelson	Ratón/gato	3q41
v-fos	Osteosarcoma de ratón FBJ	Ratón	
v-raf	Sarcoma de ratón 3611	Ratón	
v-Ha-ras	Sarcoma de rata de Harvey	Rata/ratón	11
v-bas			
v-Ki-ras	Sarcoma de rata de Kirsten	Rata	12
v-fms	Sarcoma felino SM	Gato	
v-sis	Sarcoma de simio	Mono/gato	22q11-iter

Tomado de: Willecke, K. and R. Schafer. Human Genetics (1984)

Se piensa que, durante los pasos de evolución del cáncer, un daño a nivel genético puede llevar a cambios cualitativos y/o cuantitativos en el producto génico correspondiente (Willecke y Schafer 1984). Se han dado varias explicaciones de cómo puede ocurrir lo anterior; así, se piensa que el daño puede provocar que el oncogen o su producto no puedan ser regulados, aunque su nivel de expresión no es mayor que el máximo usual (Bishop 1987). Asimismo, la anomalía puede ser el resultado de una mayor producción del producto génico (Tabin y Weinberg 1984). También se piensa que las mutaciones pueden afectar la manera en la que actúa una proteína (Bishop 1987). Por lo tanto, la transformación por oncogenes es solamente el resultado de niveles elevados de actividades bioquímicas, que en otras condiciones son normales.

2.2) Desarrollo del cáncer cérvico-uterino.

El cáncer del tracto inferior genital femenino, que comprende vulva, vagina y cervix (Peto 1986), es una de las categorías de enfermedades neoplásicas que por su alta incidencia, persiste como una de las más importantes (Parkin et al. 1984).

Se ha demostrado la existencia de una secuencia de lesiones que anteceden al cáncer de cuello uterino (CaCu) (Gissmann et al. 1983). El estudio de dichas lesiones resulta de suma importancia, ya que es un hecho comprobado que mientras más temprano sean

tratadas estas lesiones, desde el punto de vista clínico, el riesgo de progresión es menor (Hakama 1986).

El cáncer de cuello uterino se origina en el epitelio escamoso (Peto 1986). Durante el proceso de maduración normal de este epitelio, las capas basales dan origen, entre otros tipos, a células hijas que se diferencian para expresar diferentes tipos de filamentos intermedios o queratinas (Burghart 1986).

Durante la serie de eventos que lleva a la transformación maligna, se cree que un error genético, inducido quizá por el virus del papiloma humano (HPV) o por otros factores hasta ahora desconocidos, provoca que estas células adquieran la capacidad de seguirse dividiendo dentro del epitelio (Koss 1986). La evidencia de un contenido de DNA alterado en estas células, que se manifiesta como poliploidía (Reid y Fu 1986), sugiere que esta capacidad mitótica recién adquirida, carece de los mecanismos regulatorios del epitelio normal (Koss 1986)

En la zona de transformación del cérvix, el epitelio columnar se va sustituyendo, de manera secundaria, por epitelio escamoso, dando origen a la metaplasia escamosa (Burghart 1986). Es en esta zona donde generalmente se inician las lesiones, que al parecer permanecen confinadas durante la fase intraepitelial (Nelson et al. 1984).

Koss (1986), propone que de la zona de transformación, el proceso puede sufrir una regresión, volviendo el epitelio al

estado normal; o, debido quizá a las mismas lesiones iniciales y a otros cofactores, progresar a lesiones cancerosas.

Fenotípicamente, las lesiones precancerosas se caracterizan por presentar células indiferenciadas en las que decrece la producción de glucógeno, alargamiento nuclear, hipercromatismo, pleomorfismo celular, pérdida de relieve celular, cromatina gruesa o burda y figuras mitóticas anormales (Reid et al. 1984); asimismo, el grosor del epitelio y el recambio celular se ven incrementados (Nelson et al. 1984). Conforme el diagnóstico histológico empeora, se incrementan las anomalías en el contenido de DNA nuclear, declinando el número de células poliploides y aumentando el de las aneuploides (Reid y Fu 1984) (Fig. 1). Estas lesiones se encuentran sólo en el epitelio ya que no han atravesado la membrana basal; es por esto que se les agrupa como neoplasia intraepitelial cervical (NIC), y se les asigna un grado, de acuerdo con la proporción de células indiferenciadas que presentan (Richart 1973). Así, en NIC I (displasia leve), un tercio del epitelio cervical presenta el fenotipo maligno; en NIC II (displasia moderada), la lesión ocupa dos tercios del epitelio; y en NIC III (displasia severa o carcinoma *in situ*), ya han sido ocupados los tres tercios del epitelio (Nelson et al. 1984).

Actualmente, existe suficiente evidencia experimental para indicar que el virus del papiloma humano (HPV), es el factor etiológico más importante en la génesis de las neoplasias intra-

epiteliales y del carcinoma cérvico-uterino (Zur Hausen 1987).

Las infecciones del HPV en el cérvix se reconocen por la presencia de colilocitos (células que presentan núcleos con cromatina dispersa y un halo perinuclear grande) y disqueratocitos (células que muestran queratinización anormal o prematura, sin caracteristicas definitivas de cambio premaligno) (Meisels y Fortin 1976).

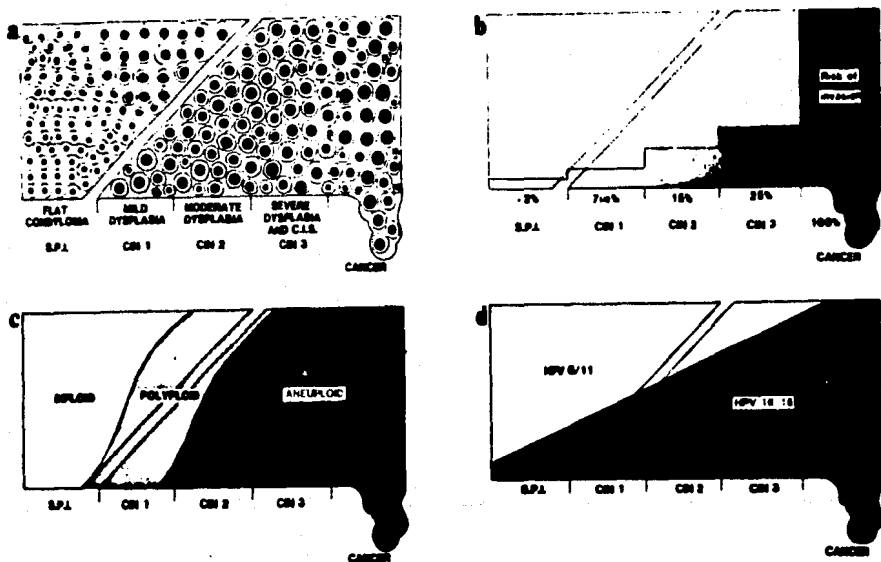


Fig. 1. Modelos esquemáticos que explican las interrelaciones entre diferentes grados de lesiones precancerosas. a) División por nomenclatura de acuerdo con la proporción de células que muestran caracteres morfológicos de expresión viral tardía (mitad izquierda) o de cambio premaligno (mitad derecha); b) riesgo aproximado de invasión para cada categoría diagnóstica; c) espectro histológico, separado de acuerdo a los patrones de ploidía; d) espectro histológico, separado de acuerdo al tipo viral. Tomado de Reid y Fu, 1986.

Estas características de infección viral se presentan muy frecuentemente en lesiones menores (del 40-50% en NIC I y NIC II), disminuyen con los grados progresivos de lesión prealigna (5-10% en NIC III) y se encuentran rarasente en carcinoma invasor (Reid y Fu 1986; Selvaggi 1986) (Fig. 1).

Al ser NIC III una lesión más avanzada y agresiva, es más probable que avance a carcinoma invasor (Nelson et al. 1984). Se ha observado, sin embargo, que algunas lesiones regresan o permanecen preinvasoras, y solo un porcentaje pequeño progresa a CaCu. Así, para NIC I el porcentaje de progresión es de 7.5%, 15% para NIC II y 25% para NIC III (Reid et al. 1984). El porcentaje de progresión de todos los tipos de NIC (34%), resulta mucho mayor que el 9.4% correspondiente a otras lesiones benignas (Syrjänen et al. 1986).

Con respecto al tiempo de evolución de estas lesiones, se ha estimado que es de 20 a 30 años de NIC I a NIC III y a carcinomas invasor, siendo la edad promedio de mujeres con NIC I de 25 años y de 50 las que presentan cáncer invasor (Hakama 1986).

También se ha detectado al HPV en un tipo de lesiones benignas denominadas condiloma acuminado (Oriel y Almeida 1970). Estas se caracterizan por presentar una organización digitiforme de tejido conectivo central, y por que las células epiteliales de la superficie son collociticas (Selvaggi 1986).

Se ha atribuido al condiloma acuminado un caracter de lesión

previa al NIC y al carcinoma invasor. Este punto de vista está apoyado en el hecho de que presentan un comportamiento epidemiológico similar al de estas lesiones (Meisels et al. 1977), siendo notoria en mujeres jóvenes una mayor frecuencia de condilomas que de cualquier neoplasia intraepitelial (Syrjänen et al. 1984). Por otra parte, se ha detectado la presencia del HPV en el 90% de los casos de condiloma acuminado (De Villiers et al. 1981; Gissmann et al. 1983). También se ha observado la coexistencia de condilomas del cérvix con NIC o CaCu en áreas adyacentes o distantes del epitelio escamoso o entrecruzados en el mismo sitio (Nelson et al. 1984). Sin embargo, solo existen reportes aislados de progresión de condiloma acuminado a neoplasias malignas (Zur Hausen 1977).

En 1976 se describió una variedad de condiloma no detectable a simple vista, pero que puede observarse en forma de manchas blancas en presencia de una solución de ácido acético al 3%; a estas lesiones se les denomina condiloma plano (Meisels y Fortin 1976). A pesar de sus diferencias macroscópicas, los tipos acuminado y subclínico comparten la misma histología y ambas formas son infecciosas (Reid y Fu 1986).

Se ha observado que el condiloma plano presenta un porcentaje de progresión a CaCu de 5-7%, mientras que 40% se revierten y un 50% permanecen estacionarios (Zur Hausen 1977).

Más recientemente se ha encontrado una variedad de condiloma plano, el condiloma plano atípico, que presenta características

simultaneas de condiloma y NIC (Meisels et al. 1981). Este tipo de lesión presenta un índice mayor de progresión a NIC comparado con el condiloma plano, siendo de 13% y 6% respectivamente (Meisels y Morin 1986; Reid y Fu 1986).

Esto demuestra la existencia de una secuencia de cambios morfológicos en la evolución a CaCu a partir de condiloma. Sin embargo, esto no resulta suficiente para predecir que a partir de una lesión benigna se origine un carcinoma invasor.

Se ha sugerido que algunos tipos del virus del papiloma humano constituyen el agente etiológico del condiloma, NIC y CaCu. Si esto es cierto, el nexo biológico en la evolución de la lesión está dado por este agente.

Estudios previos (De Villiers et al. 1981; Gissmann et al. 1982; Gissmann et al. 1983; Beckmann et al. 1985; Gross et al. 1986; Grussendorf 1986) demuestran una alta incidencia de los tipos 6 y 11 de HPV en condiloma (90%), mientras que en lesiones precancerosas (NIC I-III), la incidencia es de 25%, y en cáncer avanzado solo es del 2%. También se ha encontrado que 90% de CaCu presenta HPV, estando en una mayor proporción los tipos 16 y 18 (50-90%) (Crum et al. 1985). Estos tipos virales se encuentran en 20-80% de las lesiones preneoplásicas (Fukushima et al. 1985; Crum et al. 1985; Millan et al. 1986). En condiloma plano y acuminado, los tipos 16 y 18 han sido encontrados solo en un 5%, mientras que en condiloma plano atípico, la incidencia de HPV 16

es de 60% (Crum et al. 1984; Meisels y Morin 1986). Se ha visto además que los tipos 6 y 11 permanecen en forma episomal mientras que los 16 y 18 se integran al genoma del huésped en CaCu (Dürst et al. 1986).

3) ASPECTOS PARTICULARES

3.1) Aspectos epidemiológicos.

El CaCu constituye un importante problema de salud pública. A nivel mundial, el CaCu ocupa el quinto lugar en frecuencia de cánceres, y es el segundo más frecuente en mujer después del cáncer de mama (Parkin et al. 1984). Según informes de la Organización Mundial para la Salud (OMS), cada año se tienen 450,000 casos nuevos de cáncer de cervice (Broker y Botchan 1986).

La enfermedad presenta, sin embargo, una distribución geográfica que varía de país a país. En países desarrollados, como Estados Unidos, países de Europa, la Unión Soviética y Japón, el CaCu no es tan común como otros tipos de cáncer, como por ejemplo cáncer de mama. Lo contrario ocurre en países en vías de desarrollo como son los de Asia, Centro y Sur América y África, en los que la incidencia de CaCu es dos o hasta tres veces mayor que en Estados Unidos (Parkin et al. 1984).

Asimismo, la distribución del padecimiento varía en diferentes áreas de un mismo país, como ocurre en China, en donde es diez veces más común en algunos condados que en otros (Peto 1986). También se encuentran variaciones entre poblaciones comprendidas dentro de una misma área geográfica, como por

ejemplo en Inglaterra y Gales, donde la incidencia en 1971 fue cuatro veces mayor entre las esposas de trabajadores de escasa preparación que entre las esposas de profesionistas (Logan 1982).

Aunque en México este padecimiento es tres veces más frecuente que el cáncer de mama (De la Loza y Arriaga 1976), los registros sobre la incidencia del CaCu resultan escasos y los existentes se limitan a ser regionales. Entre 1968 y 1973 el CaCu se detectó en un 10-15% del total de tumores malignos del país, y el 13.8% del total en los estados de la frontera norte (Díaz Perches et al. 1974; Zalce et al. 1975). En Cd. Obregón, Sonora, el CaCu ocupó el primer lugar con 34% de frecuencia entre las pacientes femeninas con cáncer (Rodríguez 1983), mientras que en el Centro Médico Nacional la frecuencia entre 1965 y 1975 fue del 37% (Olper et al. 1979). Al estudiar la incidencia de casos de cáncer genital femenino en el Instituto Nacional de Cancerología, se encontró que un 88.71% correspondían a cáncer de cuello uterino (Fentanes 1979).

Con respecto a la mortalidad por CaCu, países desarrollados como Alemania, Estados Unidos y Austria presentaron una disminución de un 40, 30 y 20% respectivamente, en sus tasas de mortalidad por este padecimiento entre 1950 y 1960 (Peto 1986). Esto se debe principalmente a la aplicación de campañas de detección temprana del CaCu y los avances terapéuticos para su control (Hakama 1986). Pese a esto, la incidencia de NIC en estos países ha aumentado (Raymond 1987).

En nuestro país, quizá debido a la baja cobertura de los programas de detección y tratamiento de la enfermedad, la tasa de mortalidad muestra una tendencia a aumentar, como se desprende de los estudios de las estadísticas vitales de certificados de defunción de 1973 (De la Loza y Lima 1976). Asimismo, el CaCu provocó el mayor número de defunciones que las otras causas de cáncer entre 1970 y 1974 (De la Loza y Arriaga 1976).

Estos datos indican la necesidad de tomar medidas de control tendientes a disminuir la incidencia de CaCu, y para ello un paso importante consiste en determinar los factores de riesgo asociados a la enfermedad.

3.2) Etiología de la enfermedad.

Los estudios epidemiológicos sobre los factores asociados a CaCu coinciden en señalar que algunos aspectos del comportamiento sexual resultan de suma importancia. Entre estos factores se consideran principalmente el inicio temprano de las relaciones sexuales, existencia de varias parejas sexuales y hábitos higiénicos deficientes. Existen también otros factores a considerar, como es la posibilidad de contagio por parte de la pareja sexual y hábitos tabáquicos, entre otros. A todos estos factores se hará referencia más adelante.

Uno de los factores estudiados primeramente ha sido el

inicio temprano de las relaciones sexuales, aunque todavía existe controversia a este respecto. Algunos autores (Coppleson y Reid 1968; Rotkin 1981) sugieren que cuando las relaciones sexuales se inician a edad temprana (17 o menos) existe mayor vulnerabilidad a agentes oncogénicos. Sin embargo, otros (Klein 1973; La Vecchia et al. 1985) señalan que esto quizá se deba a un mayor periodo de exposición a esos agentes.

Por otra parte, gran parte de la evidencia epidemiológica apoya el hecho de que conforme el número de parejas sexuales aumenta, se aprecia un incremento en el riesgo relativo de padecer la enfermedad (Rotkin 1973). Este riesgo, que se manifiesta de manera lineal, se ve aumentado tres veces en personas con cinco o más parejas sexuales (Brinton 1986).

Por muchos años, los estudios epidemiológicos sobre cáncer genital femenino se basaron únicamente en el comportamiento sexual femenino para explicar su etiología; más la evidencia reciente señala la importancia del papel que juega la pareja sexual (Brinton 1986). Algunos estudios (Cartwright y Simpson 1980; McGregor e Innes 1980; Li et al. 1982) demuestran una asociación geográfica entre la incidencia de CaCu y cáncer de pene. Asimismo, se reporta una mayor incidencia de CaCu en las esposas de hombres con cáncer de pene (Martínez 1969; Graham et al. 1979; Smith et al. 1980). Existen otras evidencias que señalan la importancia de la pareja como la de Kessler (1977) que reportó en un estudio que las mujeres con más incidencia de CaCu tenían esposos cuya pareja anterior tenía CaCu; y el estudio de

Bukley et al. (1981) en mujeres con una sola pareja sexual, cuyos maridos confesaron tener varias parejas, así como experiencias sexuales tempranas.

Asimismo, se ha encontrado que el CaCu es más frecuente en prostitutas y excepcional en mujeres vírgenes (Brinton 1986) Kessler 1986).

De estos estudios se desprendió la idea de que debería existir un agente etiológico sexualmente transmisible. Durante mucho tiempo se buscó agentes causales en bacterias como Treponema pallidum, Neisseria gonorrhoeae y Chlamidia trachomatis, y también en protozoarios como Trichomonas vaginalis (Boyd y Doll 1964). Se ha demostrado que existe una estrecha relación entre la distribución geográfica, curso temporal de la enfermedad, clase social y ocupación de las enfermas que presentan estos agentes y CaCu, lo que confirma una naturaleza venérea de la enfermedad (Beral, 1974). Sin embargo, no se han encontrado evidencias experimentales que apoyen que estos organismos son agentes causales, por lo que se piensa que su relación es más bien secundaria (Broker y Botchan 1986).

Más recientemente se han buscado agentes virales como el virus del herpes simplex 2 (HSV 2) (Kessler 1986) y el virus del papiloma humano (HPV) (Durst et al. 1983).

La asociación del HSV 2 con CaCu obedece a que se ha reportado que un alto porcentaje de pacientes con CaCu (91%),

presentan anticuerpos específicos contra antígenos del virus, con respecto a los controles en los que solo se encontró en 10-50% (Rawls y Adams 1981); también se ha detectado la presencia de proteínas AG-4 de HSV 2 en células cancerosas del cérvix (Aurelian et al. 1981). Asimismo, se ha observado un incremento en la incidencia de carcinoma *in situ* paralelo al aumento de infecciones virales por el HSV 2 (Naib et al. 1969). Además, el HSV 2 es conocido como agente sómamente oncogénico, ya que es capaz de transformar células de roedores (Sugden 1986), y de provocar lesiones en el DNA (Schlehofer 1986).

Sin embargo, existe suficiente evidencia para descartar esta posibilidad. En primer lugar, no hay diferencias séricas entre controles y casos de CaCu, ambos con más de una pareja sexual, por lo que puede decirse que la asociación de este virus es colateral (Vonka et al. 1984; Rawls et al. 1986). Por otra parte, solo se han detectado porcentajes bajos de DNA o RNA de HSV 2 (2-17%) en CaCu (Eglin et al. 1981), además de que las mismas regiones del genoma viral no han sido encontradas de manera consistente (Rawls et al. 1986).

El virus del papiloma humano había sido detectado desde 1907 por Ciuffo como el agente infeccioso de verrugas vulgares (Pfister 1984). Por otra parte, el virus del papiloma del conejo cola blanca (CTPV), fue el primer virus oncogénico de DNA en ser aislado y caracterizado por Shope y Hurst en 1933 (Pfister 1984). Pero la imposibilidad de montar un sistema *in vitro* y su alta especificidad para el hospedero frenaron la investigación y se

buscaron otros modelos más accesibles para el estudio del cáncer, como el virus del polio de ratón y el virus vacuolante de simio 40 (SV40).

El motivo por el que el virus del papiloma humano se mantuviese sin ser descubierto se debió a las técnicas de detección empleadas, que consistían en pruebas inmunológicas y escrutinio del tejido por microscopia electrónica. Estas técnicas no eran capaces de detectar la presencia del HPV aún existiendo en cantidades significativas: la mitad de las veces o más, diferían sus resultados de los obtenidos por otros métodos; principalmente porque en este estado, el virus se encuentra no productivo (con su DNA integrado al genoma del huésped) (Zur Hausen 1977).

El virus del papiloma solo ha sido abordado con el surgimiento de nuevas técnicas en biología molecular que han permitido su clonación y manipulación sin tener aún un sistema in vitro para su estudio (Broker y Botchan 1986). Los primeros estudios se llevaron a cabo con preparaciones de cDNA obtenidos a partir de una verruga plantar (Rowson y Mahy 1967). Los primeros datos de hibridación demostraron que muchos, aunque no todos los DNAs de las verrugas comunes hibridaban con la sonda en condiciones estrictas. Las partículas virales habían sido ya detectadas por microscopia electrónica (Zur Hausen et al. 1974). Esto sugería la existencia de tipos virales diferentes, mismos que fueron identificados posteriormente (Gissmann et al. 1977; Orth et al. 1977). Los ensayos de hibridación en condiciones

relajadas han permitido detectar con mayor frecuencia al virus del papiloma en las lesiones condilomatosas, displasias y CaCu. A partir de este momento, se han identificado un gran número de tipos y subtipos del HPV, mismo que sigue en aumento (Syrjänen 1987).

De los virus del papiloma detectados, siete son los asociados al cáncer genital: HPVs 6, 11, 16, 18, 31, 35, 37. De los cuales HPV 6 y 11 se han encontrado en un 90-100% de las lesiones benignas y los tipos 16 y 18 en un 30-40% de CaCu. Además HPV 16 se ha encontrado en lesiones precancerosas. El resto se encuentra asociado a lesiones malignas en pequeñas proporciones (Syrjänen 1987).

Pero la sola presencia del HPV no es indicativo de que el virus sea el factor etiológico del CaCu. Experimentos recientes han permitido comprobar experimentalmente la capacidad transformante del HPV. En epitelios sanos de cervix expuestos a HPV 11 e injertados debajo de la cápsula renal de ratones atímicos, se obtuvo transformación en epitelios neoplásicos (Kreider et al. 1985; Kreider et al. 1987). Además, mediante experimentos de transfección *in vitro* con HPV 16 se ha logrado transformación maligna de fibroblastos y queratinocitos humanos (Yasumoto et al. 1986; Yasumoto et al. 1987; Pirisi et al. 1987).

La sola presencia de los HPVs 16 y 18 en CaCu, no parece suficiente para asegurar el desarrollo de un carcinoma a partir de una lesión preneoplásica de alto riesgo, puesto que solo un

bajo porcentaje de esos casos progresa (Broker y Botchan 1986). Estudios de fusión de células HeLa (que presentan HPV 18) con fibroblastos normales, demuestran la supresión del fenotipo maligno; sin embargo, la pérdida del cromosoma 11 en el donador no transformado, revierte este fenotipo (Stanbridge et al. 1982). Estos datos han llevado a zur Hausen (1987) a postular la existencia de un control de la expresión de HPV mediado por genes celulares. De acuerdo con este autor, la inactivación funcional de estos genes es el resultado de factores externos que modifican las funciones de control de estos genes, o los sitios de reconocimiento para el factor supresor. Esto explicaría los largos periodos de latencia existentes entre la infección primaria del virus y la aparición del tumor.

Los factores de crecimiento viral modificados por los genes celulares no se encuentran bien definidos. Sin embargo, estudios epidemiológicos han puesto de manifiesto la existencia de algunos de ellos. Entre éstos se han señalado los siguientes:

1. La posibilidad de que el HSV 2 pueda actuar como iniciador de la transformación vía una acción de tipo "pega y corre" (Galloway y McDougall 1983), o mediante la inserción de secuencias similares a "IS" (McDougall et al. 1986).

2. Antecedentes de infecciones venéreas por bacterias y protozoarios, cuya presencia puede dar como resultado alteraciones en el DNA del HPV y/o del huésped (Franceschi et al.

1986).

3. También se tiene la observación de que mujeres con hábitos tabáquicos presentan más frecuentemente neoplasias cervicales que las no fumadoras, y la presencia de metabolitos químicos del cigarro en el mucus de cervix sugiere una acción directa del compuesto químico del cigarro con las células infectadas (Paterson-Vessey 1986).

4. Asimismo, en individuos con deficiencias en el sistema inmunológico, como son individuos inmunosuprimidos farmacológicamente (p. ej. para trasplantes), con cáncer o SIDA y en mujeres embarazadas, se observa a menudo la aparición de verrugas debido a infección por HPV (Brinton 1986).

3.3) Aspectos moleculares

El virus del papiloma humano se considera el agente causal del cáncer de células escamosas. Sin embargo, su mecanismo de acción no es del todo conocido, quizá debido a la imposibilidad de encontrar un sistema de células que permita su propagación lítica y manipulación genética. Pese a ello, el virus del papiloma resulta un interesante modelo de estudio; esto ha permitido relacionarlos a un gran número de padecimientos, así como la definición de los genes que intervienen en su transformación, replicación y regulación. Asimismo, constituyen modelos interesantes para el estudio de latencia viral y control

de la replicación del DNA, pudiendo además ser utilizados como vehiculos de expresión de genes externos en células de mamífero (Broker y Botchan 1986).

3.3.1) Clasificación del virus del papiloma.

El virus del papiloma pertenece al género *Papillomavirus*, y ha sido agrupado junto con el virus del polioma de ratón, SV40 y los virus BK y JC de humano, en una misma familia, la Papovaviridae (Matthews 1982). Sin embargo, esta clasificación no toma en cuenta que el virus del papiloma, a pesar de ser de doble cadena de DNA, tener una cápside icosaédrica y ser condensado por nucleosomas al igual que los otros virus de esta misma familia (Zur Hausen 1977; Pfister 1984), difiere significativamente de ellos en cuanto a tamaño, que es de 55 nm contra los 45 nm de los demás, en tener 7900 pb aproximadamente contra los 5250 de SV40. Además, el HPV presenta sus marcos de lectura abierta en una posición diferente a la de los demás, y su información es leída en una sola hebra del DNA mientras que en los otros virus los marcos de lectura están repartidos en ambas hebras. Otra diferencia importante es que en tanto el SV40 puede ser propagado *in vitro* al virus del papiloma no ha sido posible propagarlo de esta manera, además de que este último presenta una alta especificidad por determinado tejido (epitelial de mucosa o cutáneo) mientras que SV40 infecta en una gran generalidad de órganos y tejido neuronal (el virus del papiloma solo se ha visto

que infecte otro tejido que no es el epitelio, en borregos y cabras y es en fibroblastos dermales) (Broker y Botchan 1986).

Por otra parte, existen virus del papiloma en anfibios, reptiles, aves y en mamíferos, y son relativamente diferentes entre sí (Lancaster et al. 1982). Aún en el caso del hombre se han detectado 42 diferentes tipos del virus del papiloma, definidos por presentar una hibridación cruzada inferior del 50% en fase líquida. Cada tipo se encuentra asociado a padecimientos específicos (tabla II).

Tabla II. Tipos reconocidos de HPV y sus manifestaciones clínicas.

Tipo de HPV	Manifestación clínica
HPV 1a, b, c	Verrugas plantares de tipo minercia
HPV 2a-e	Verrugas comunes, verrugas filiformes, verrugas plantares de tipo mosaico, verrugas palatales.
HPV 3a, b	Verrugas planas, verrugas juveniles, formas leves de EV.
HPV 4	Verrugas palmares y plantares de tipo hiperqueratótico
HPV 5a, b	Lesiones maculares de EV
HPV 6a-f	Condylomata acuminata, NIC I-III, NIV I-III, papilomas laríngeos
HPV 7	Verrugas comunes en las manos de carniceros
HPV 8	Lesiones maculares de EV
HPV 9	Lesiones maculares y verrugas planas de EV
HPV 10a, b	Verrugas planas
HPV 11a, b	Condylomata acuminata, NIC I-III, papilomas laríngeos, papilomas conjuntivos.
HPV 12	Lesiones maculares y verrugas planas de EV
HPV 13a, b	Hiperplasia epitelial focal en boca

Tabla II. Continuación.

Tipo de HPV	Manifestación clínica
HPV 14a, b	Lesiones maculares y verrugas planas de EV
HPV 15	Lesiones maculares y verrugas planas de EV
HPV 16	Condylomata acuminata, NIC I-III, NIV I-III, papulosis bowenoide, carcinoma de cérvix y pene
HPV 17a, b	Lesiones maculares y verrugas planas de EV
HPV 18	Condylomata acuminata, NIC I-III, NIV I-III, papulosis bowenoide, carcinoma de cérvix y pene
HPV 19-29	Lesiones maculares y verrugas planas de EV
HPV 30	Carcinoma de células escamosas de laringe
HPV 31	NIC I-III, carcinoma de cérvix
HPV 32	Hiperplasia epitelial focal en boca
HPV 33	Papulosis bowenoide, NIC I-III, carcinoma de cérvix
HPV 34	Papulosis bowenoide, enfermedad de Bowen
HPV 35	NIC I-III, carcinoma de cérvix
HPV 36	Queratosis actínica, queratoacantoma
HPV 37	Queratoacantoma, melanoma maligno
HPV 38	Melanoma maligno
HPV 39	Carcinoma de cérvix
HPV 40	Carcinoma laríngeo
HPV 41	Lesiones múltiples de verrugas planas de la piel
HPV 42	Papilomas genitales, papulosis bowenoide, condilomas panos

Abreviaturas: NIC= neoplasia intraepitelial cervical; NIV= neoplasia intraepitelial vulvar; EV= epidermoplastia verruciformis

Tomado de: Syrjanen, K.J. *Med. Biol.* 65: 21-39 (1987)

3.3.2) Estructura del genoma del virus del papiloma

Se tienen secuenciados alrededor de 10 virus del papiloma (Giri et al. 1986), y puede apreciarse que no existen grandes diferencias en cuanto a la disposición de los marcos de lectura abierta detectados por cómputo. El tamaño es de alrededor de 8 kpb, los marcos de lectura abierta se localizan de un solo lado de la doble hélice.

El genoma del virus se divide funcionalmente en dos grandes dominios (Fig. 2), que han sido elegidos por observaciones realizadas en el virus del papiloma de bovino (BPV) (Syrjänen 1987); por tanto, todas las observaciones que se hagan serán referentes a este virus, a menos que se indique lo contrario.

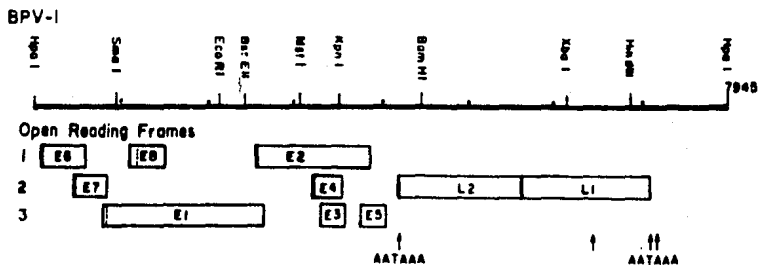


Fig. 2. Organización genética del virus del papiloma de bovino tipo 1. Se representa el genoma como una molécula linear abierta en el nucleótido 1 (sitio de restricción Hpa I). Se señalan las posiciones de los sitios para varias endonucleasas de restricción, marcos de lectura abierta y secuencias AATAAA (↑), precedidas a partir de su secuencia de nucleótidos. Tomado de Broker y Botchan, 1986.

El primer dominio, que comprende el 60% del total, es una región llamada E y que es capaz por sí sola de transformar, además de poseer la información para la replicación del virus. Este dominio tiene unas seis regiones codificadoras (genes) en el caso de HPV 1, siete en los HPVs 6b, 11, y 16 y en el caso de HPV 8 solo cinco (Broker y Botchan 1986).

El gen E1 en 3' está involucrado en el mantenimiento del estado de plásmido y su replicación (Sarver et al. 1984; Lusky y Botchan 1985); el extremo carboxilo terminal de la proteína codificada presenta homología con el antígeno T de SV40 que tiene interacción directa con el DNA (Giri y Danos 1986). Este gen E1 en 5' codifica un factor que actúa como modulador de la replicación del DNA viral (Lusky y Botchan 1986; Roberts y Weintraub 1986).

El gen E2 está sobrelapado con el gen E4 y presenta en el extremo carboxilo terminal de la proteína para la que codifica, cierta semejanza con una porción del oncogen *gag* (Giri y Danos 1986). Asimismo, se ha demostrado que E2 codifica para un factor que interactúa con un "enhancer" condicional en la región grande de control (LCR) para activar la transcripción (Spalholz et al. 1985; Yang et al. 1985). Además se ha demostrado que la proteína E2 se une al DNA con especificidad para una secuencia "core": ACCN GGT (Androphy et al. 1987).

En varias líneas celulares, así como en carcinomas

cervicales y uno de pulmón, todos positivos para HPVs 18 ó 16, se ha encontrado que las regiones tempranas E1 y E2 se abren para dar lugar a la integración del virus, como un prerrequisito para la conversión maligna (Durst et al. 1986).

Se cree que el gen E4 interviene en la maduración del virus, por lo que no se le puede considerar como parte de los genes tempranos (Gissmann y Zur Hausen 1978). El gen 4 del HPV la codifica una proteína citoplasmática abundante, que parece expresarse coordinadamente con la mayor proteína de la cápside (Doobar et al. 1986).

E5 es un gen que, al ser mutado en HPV 1 reduce la capacidad transformante del virus, además de que se ha demostrado que codifica para una proteína transformante (DiMaio et al. 1986; Groff y Lancaster 1986). Se localiza entre los genes E2 y L1 con cierto solapamiento.

E8 y E3 son genes propuestos por análisis de secuencia y no se sabe si tienen algún significado biológico (Syrjänen 1987).

Los genes E6 y E7 se encuentran involucrados en el mantenimiento de un alto número de copias del plásmido (Lusky y Botchan 1985; Berg et al. 1986). El gen E6 bajo el control de un "long terminal repeat" (LTR) es capaz, por sí solo, de transformar células de ratón (Giri y Danos 1986). Además, en DNA complementario de BPV 1 existe fusión génica de E6 y E7, lo

que puede dar una nueva especificidad a la proteína (Giri y Danos 1986).

Además de la región E existe la región L que presenta dos marcos de lectura abierta: L1 y L2. L1 es el principal componente de la cápside (Engel et al. 1983; Pilacinski et al. 1984) y es muy similar en los diferentes tipos virales, además de que inmunológicamente da reacciones cruzadas entre diversos virus del papiloma (Jenson et al. 1980; Woodruff et al. 1980).

El gen L2 de HPV 1a codifica para un componente menor de la cápside (Pilacinski et al. 1984; Komly et al. 1986). Existe además una región identificada en BPV 1 llamada URR que tiene regiones de "enhancer" para E2 y probablemente para otros genes, además de ser el sitio de origen de la replicación en una secuencia llamada PMS 1, que a diferencia de SV40, no tiene repetidos invertidos. Existe otra secuencia llamada PMS 2 que se encuentra en medio de E1; esta zona PMS 1 actúa en cis con un "enhancer" (Broker y Botchan 1986).

Existe además, una sola región no codificadora que contiene elementos regulatorios conservados, tales como los promotores de la RNA polimerasa II o sitios de poliadenilación (Broker y Botchan 1986).

3.3.3) Interacción virus-hospedero.

Se ha propuesto, que la interacción virus-hospedero se inicia con la infección por el virus de una célula epitelial queratinocítica basal no diferenciada, ya que son estas células las que presentan actividad mitótica, a diferencia de las ya diferenciadas que no presentan división y de las células epiteliales superficiales que carecen de núcleo y que por tanto no pueden mantener un crecimiento viral (Howley 1983; Gissmann 1984).

Se ha propuesto un modelo de infección clonal, en el cual solo una o unas cuantas células poseen el virus, lo cual permitiría interpretar los resultados negativos, no como ausencia del virus en células basales, sino como falta de sensibilidad en la técnica (Taichman et al. 1983).

La célula queratinocítica presenta una serie de cambios fisiológicos, a los cuales pudiese responder el virus del papiloma, activando la expresión de los genes para replicación vegetativa o de integración y transformación (Taichman et al. 1983).

Para comprender por qué el queratinocito está en constante cambio fisiológico, hay que observar la maduración del epitelio de útero y cérvix, donde la célula queratinocítica basal se divide dando lugar a células que migran hacia la superficie del

epitelio de manera vertical, y que en el curso de esta migración, se van diferenciando. En este proceso, hay activación de unos genes y desactivación de otros, como es el caso de los genes que codifican para la queratina, que en un momento dado se activan y que posteriormente se desactivan, para dar lugar a la formación de filamentos característicos del estratum spinosum y del granulosum; finalizando el proceso con la formación de puentes disulfuro entre las fibras de queratina, que origina una capa impermeable con células anucleadas en descamación. Todo este proceso se lleva a cabo en un plazo de 10 a 14 días, durante los cuales la célula queratinocítica ha pasado por estadios fisiológicos diferentes (Franke et al. 1986).

La zona de replicación vegetativa del virus, así como de transformación, está comprendida entre el epitelio columnar y escamoso del cérvix, y es aquí donde aparecen las células coilocíticas, que presentan un halo claro alrededor del núcleo, así como figuras mitóticas anormales en el caso de transformaciones (Spriggs et al. 1971; Fu et al. 1981; Reid et al. 1984), y se detectan partículas virales, por lo que en estas células ya hay reconocimiento antigénico contra productos proteicos virales (Croissant et al. 1985; Steinberg 1986).

Es de esperar que el mejoramiento de las técnicas de hibridación in situ arrojen mayor número de datos sobre el origen y evolución de la infección viral.

Por otra parte, una vez que el virus se ha introducido en la

célula, se pueden tener dos formas de presencia física del virus: como plásmido o bien de manera integrada en el genoma del hospedero (Howley et al. 1986). En los casos de condiloma se han detectado los virus HPVs 6 y 11, así como los HPVs 16 y 18 aunque éstos en una frecuencia mucho menor, (Wettstein et al. 1982; Gissmann et al. 1982; Lancaster et al. 1983; Durst et al. 1985) siempre en forma extracromosómica los cuatro. Sin embargo, en el caso de displasias y CaCu, los HPVs 16 y 18 se encuentran frecuentemente integrados en el genoma, con lo cual se modifican ciertas señales de regulación (Ostrow et al. 1982; Lehn et al. 1984; Lehn et al. 1985; Grussendorf-Conen et al. 1985; Pater y Pater 1985; Diluca et al. 1986; Kahn et al. 1986), ya que se da la integración rompiendo la cadena de DNA en la región E2 que posee varias señales de regulación del virus (Sarver et al. 1984; Yang et al. 1985; Giri y Danos 1986).

Cuando un HPV se encuentra como episoma, presenta un origen de replicación bidireccional (Lusky y Botchan 1984; Waldek et al. 1984; Lusky y Botchan 1986), que permite generar aproximadamente entre 100 y 200 copias del DNA viral por célula, que posteriormente se encapsida y sale de ésta a infectar otras células. En el caso de darse la integración, el DNA viral puede generar multicopias consecutivas en el genoma del hospedero que no se encapsidan, por lo que el virus se perpetúa junto con la célula transformada (Pater y Pater 1985; Yee et al. 1985; Schwarz et al. 1985; Durst et al. 1986; Matsukura et al. 1986).

3.3.4) Estructura del oncogen myc.

El oncogen celular myc (c-myc) posee tres exones, de los cuales, el primero presenta señales de regulación (Battey et al. 1983; Bernard et al. 1983) como son tres promotores. El promotor P2 en el inicio del exón y junto a él, hacia el extremo 5', otro promotor P1, y junto a éste, más hacia el extremo 5', un tercer promotor P0 (Bentley y Groudine 1986).; este primer exón de 400-500 pb no presenta codones de inicio pero si de término (Cole 1986).

Los oncogenes virales myc (v-myc) observados, no presentan el primer exón, así como tampoco las señales de regulación en la zona 5' de este exón, solo presentan alta homología con el segundo y tercer exón del myc celular (Stanton et al. 1983).

Se ha observado que en varias lesiones cancerosas, c-myc se encuentra translocado del cromosoma 8 de la banda q24 al cromosoma 14 en la banda q32 en el gen que codifica la cadena pesada μ de las inmunoglobulinas (Ig), o bien al cromosoma 2 en el gen de la cadena kappa de las Ig, o en el cromosoma 22 en la cadena lambda de las Ig. Al darse la translocación se separa el primer exón, que no se transloca, mientras que los dos exones siguientes se translocan con una subsecuente sobre-expresión del gen (Kelly 1986).

Myc produce una proteína fosforilada, que se circunscribe al

núcleo y que tiene afinidad por el DNA (Persson y Leder 1984; Eisenman et al. 1985; Donner et al. 1982) y se presupone que es capaz de activar o incrementar la síntesis de diversos genes (Feldman y Nevins 1983). Dicha proteína tiene una vida media de 20 a 30 minutos, y se presenta después de que el oncogen fos ha sido activado, 10 minutos después de los estímulos inductores. Estos pueden ser factores de crecimiento como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el factor de crecimiento epidermal (EGF) o bien compuestos sintéticos como el forbol ester (Greenberg et al. 1986).

En el caso de células cancerosas con inserción de HPV, se ha reportado al gene myc activo (Durst et al. 1987) y amplificado de tres a treinta veces en estados avanzados de la enfermedad (Riou et al. 1984).

4) OBJETIVOS

La presencia de los HPVs 16 y 18 en estados avanzados del CaCu sugiere la existencia de una población con alto riesgo para esta enfermedad. Esto abre la posibilidad de utilizarlos en pruebas de detección en lesiones preinvasoras tempranas, lo que permitiría distinguir a aquellas pacientes que requieren un tratamiento extenso de las que no lo necesitan.

Además, los datos sobre la incidencia de este virus se limitan a los encontrados en países desarrollados. Resulta por tanto, importante conocer si las frecuencias reportadas son iguales en nuestro país, ya que el CaCu es muy común en la población mexicana.

También nos interesa conocer el estado físico en que se encuentra el virus en estas lesiones, ya que se han encontrado los tipos 16 y 18 integrados al genoma en CaCu, y en forma episomal en condiloma y algunas NIC, ya que estos datos nos permiten comenzar a explorar, en qué momento se da la integración del virus, con la consecuente modificación de la expresión de sus genes.

Por otra parte, se conoce el papel que juegan los oncogenes en la génesis del cáncer. Se ha encontrado activo y amplificado

el oncogen myc en CaCu, por lo que, conocer si esta activación se da o no en etapas previas a esta enfermedad, nos ayudaría a comprender mejor la fisiología de esta transformación.

Por lo tanto, para la realización del presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Conocer la incidencia de los tipos 6, 11, 16 y 18 del virus del papiloma humano en lesiones benignas y precancerosas del tracto genital, en pacientes de dos hospitales capitalinos.

2. Determinar el estado físico del DNA viral (episomal o integrado), en distintos tipos de estas lesiones.

3. Detectar activación del genoma viral.

4. Correlacionar la presencia del virus y el tipo de lesión con su ubicación y el sexo del paciente.

5. Determinar la posible amplificación del oncogene c-myc en diversos tipos de lesiones.

5) MATERIAL Y METODOS

5.1) Obtención de biopsias.

Las biopsias obtenidas de pacientes con diagnóstico clínico de condiloma o NIC, fueron proporcionadas por el Hospital Central Militar y el Hospital Regional "Adolfo López Mateos" del ISSSTE, de la Ciudad de México. Las muestras, en su mayor parte de cérvix, vulva y pene, fueron colectadas y colocadas inmediatamente en hielo seco para posteriormente ser procesadas en el laboratorio. Para cada muestra se obtuvieron los siguientes datos: número de muestra, fecha, hospital, diagnóstico clínico, diagnóstico histológico, nombre del paciente, edad, sexo, cédula hospitalaria, ocupación, estado socio-cultural y procedencia; asimismo se obtuvieron datos de los siguientes antecedentes: tabaquismo, uso de anticonceptivos, inicio de la vida sexual activa, número de parejas sexuales, infecciones genitales previas, citologías anormales previas, lesiones genitales en el cónyuge, tratamiento previo y otros.

5.2) Transformación bacteriana.

Se realizó utilizando el método de Cohen et al (1982). Se utilizaron las cepas C-600, HB-101 y MC-1061 de la bacteria

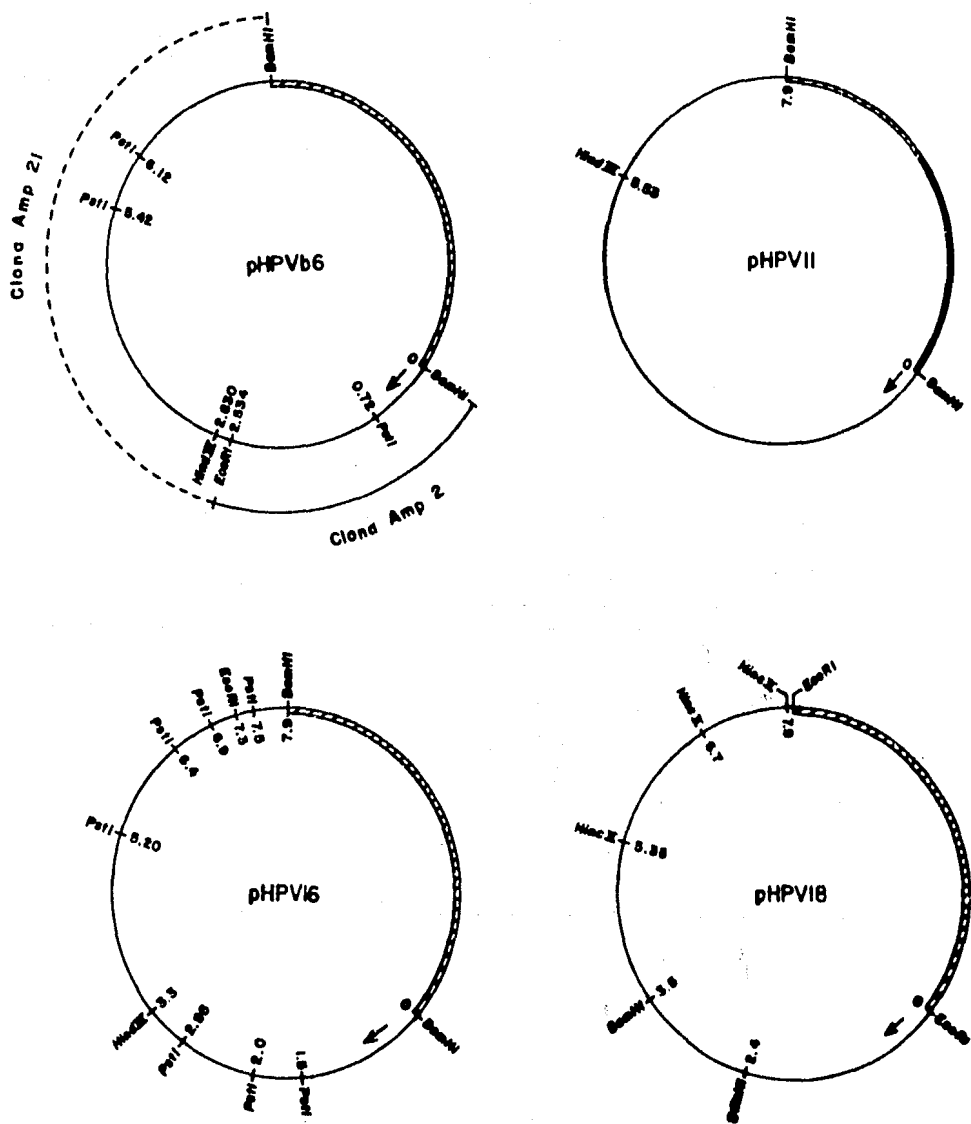


Fig. 3. Mapas de restricción de los cuatro tipos de HPV. Las posiciones de los sustratos para varias endonucleasas de restricción se señalan en Kpb. La región marcada con líneas representa al vector pBR322. A. pHPV6b (Gissmann et al. 1982; Rando et al. 1986). B. pHPV 11 (Broker y Chow 1986; Broker y Botchan 1986). C. pHPV 16 (Dürst et al. 1985; Takebe et al. 1987). D. pHPV 18 (Broker y Chow 1986; Broker y Botchan 1986).

Escherichia coli, como recipientes para los plásmidos vectores de HPVs 6, 11, 16 y 18 (fig. 3). así como para el plásmido con el inserto v-myc (fig. 4). Los vectores utilizados fueron pBR322 y pBR313 para los HPVs y v-myc respectivamente. Los virus HPVs 6, 11, 16 y 18. fueron donados por el Dr. Lutz Gissmann (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, Alemania Federal) al Dr. Mario Castañeda, y el oncogene viral se compró de la colección de oncogenes y proto-oncogenes de American Type Culture Collection.

5.2.1) Medio de cultivo.

Se utilizó el medio Luria-Bertrani (LB), preparado a partir de 10 gr de peptona o triptona de caseína, 10 gr de cloruro de sodio y 5 gr de extracto de levadura, por litro de agua, ajustándose el pH a 7.6. Para un medio sólido se agregaron 15 gr de bacto-agar. El medio se esterilizó en una autoclave a 20 lb. de presión durante 20 min. Debido a que el plásmido confiere resistencia a antibióticos a la bacteria transformada, la selección de éstas se realizó agregando ampicilina al medio a una concentración de 100 µg/ml (Maniatis et al., 1982).

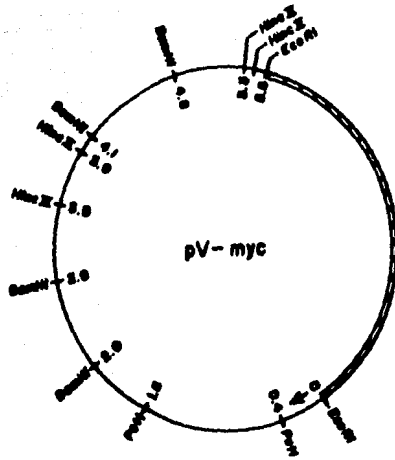


Fig. 4. Mapa de restricción de pV-myc. Las posiciones de los sustratos para varias endonucleasas de restricción se señalan en Kpb. La región marcada con líneas representa al vector pBR313. (Vennstrom et al. 1981).

5.2.2) Preparación de células competentes.

Se tomó una colonia de bacterias de la cepa a utilizar y se inoculó en 5 ml de medio LB, dejándose en agitación (200 rpm) a 37°C toda la noche. Se tomaron 1.25 ml de este cultivo y se inocularon en 100 ml de medio nuevo, agitando a 37°C hasta que alcanzó una densidad óptica (DO) de 0.6 a 600 nm de longitud de onda. Se colocó en hielo por 10 min, y posteriormente se centrifugó a 8000 g (rotor GSA, centrifuga Sorvall) para cosechar las bacterias. El botón fue resuspendido en la mitad del volumen inicial de CaCl₂ 100 mM en Tris-HCl a pH 8.0 10 mM y se incubó en

hielo por 30 min. Se centrifugó a 6000 g por 10 min y el precipitado se resuspendió en 1/10 del volumen inicial. Las células así obtenidas son susceptibles de transformación durante 6 días si son almacenadas a 4°C (Mandel y Higa 1970; Dagert y Ehrlich 1979).

5.2.3) Transformación.

Se colocaron en un tubo 200 µl de células competentes, 0.5 µg de DNA para transformar (plásmido con el inserto correspondiente) y 10 a 20 µl de 6,6,0.2 (NaCl 6 mM, tris-HCl (pH 7.5) 6 mM y EDTA 0.2 mM) dejándose incubando en hielo por 30 min. Las bacterias fueron sometidas a shock térmico colocándolas a 42°C por 90 seg. Se agregaron 2 ml medio LB dejándose en agitación durante 45 min a 37°C. Se plaquearon en cajas con medio selectivo. Tanto las cepas bacterianas solas como aquellas conteniendo plásmidos marcadores, fueron mantenidas en cajas de Petri con medio LB con agar, y en caso necesario, con ampicilina a la concentración señalada. Las resiembra se realizaron aproximadamente cada mes, tomando una colonia de la caja y expandiéndola en una nueva por el método de estriación (Maniatis et al. 1982). De esta manera se asegura el tener colonias aisladas. Las cajas así sembradas se mantuvieron a 37°C de 16 a 24 hrs. y guardadas a 4°C hasta la siguiente resiembra.

5.3) Purificación de plásmidos a gran escala.

Se realizó por el método de hidrólisis alcalina de Birnboim y Doly (1979), modificado por R. Hernández (comunicación personal).

5.3.1) Crecimiento de bacterias y amplificación de plásmidos.

Para la amplificación de plásmidos se utilizó el método publicado por Maniatis et al (1982), de acuerdo con el cual, se tomó una colonia de la cepa recipiente del plásmido a extraer, y se inoculó en 5 ml. de medio LB con selector de resistencia, y se dejó creciendo en agitación (200 rpm) a 37°C toda la noche. Transcurrido este tiempo se tomaron 50 μ l. y se inocularon en un volumen de 12.5 ml. de medio con ampicilina (100 μ g/ml) que se incubaron hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 600 nm de longitud de onda, con el fin de tener una población viable de 1×10^8 células/ml en fase logarítmica. A los 12.5 ml de cultivo, se les añadieron 250 ml más de medio con ampicilina y se dejaron creciendo a 37°C hasta alcanzar una D.O. de 0.4 que es el inicio de la fase logarítmica del crecimiento. Cuando el cultivo alcanzó esta fase se le adicionaron 170 μ g/ml de cloranfenicol, con el fin de frenar la replicación cromosómica e incrementar la replicación del plásmido, ya que éste no resulta tan sensible al antibiótico. Se incubó de 12 a 16 hrs. y se procedió a extraer los plásmidos.

5.3.2) Extracción de plásmidos.

El cultivo de bacterias con el plásmido se centrifugó a 8000 g durante 20 min. (rotor GSA, centrifuga Sorvall). El botón celular se resuspendió en 25 ml. de una solución de glucosa o dextrosa 50 mM, EDTA 10 mM, tris-HCl (pH 8.0) 25 mM, y 50 mg de lisozima (Sigma). Se incubó una hora en hielo-agua. Después de este tiempo se agregaron 50 ml de una solución de hidróxido de sodio 0.2 N y SDS 1% w/v, y se dejó en hielo por 5 min. Se añadieron 37.5 ml de una tercera solución de acetato de sodio o potasio 3M y ácido acético glacial al 11.5% v/v, y se incubó una hora en un baño de hielo-agua. Se centrifugó a 8000 g por 50 min. a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se dejó precipitando por una hora a -70°C o bien a -20°C toda la noche en 0.6 volúmenes de isopropanol o en dos volúmenes de etanol. Se centrifugó a 8000 g por 50 min. a 4°C y el botón conteniendo los plásmidos fue resuspendido en una mezcla de NaCl 6 mM, tris-HCl (pH 7.5) 6 mM y 0.2 mM de EDTA (6,6,0.2). Por último, el exceso de RNA fue eliminado con una incubación de RNAsa (Sigma)(20 ug/ml) por una hora a 37°C. La digestión se frenó con 0.5 ml de tris-HCl (pH. 9.5) 1 M y 0.4 ml de sarkosil al 10%, seguido de extracciones con fenol-agua y con cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Se centrifugó a 8000 g 10 min., recuperándose la fase acuosa.

5.3.3) Gradiente de cloruro de cesio.

Para purificar los plásmidos se hizo un gradiente de cloruro de cesio, siguiendo el método descrito por Maniatis et al. (1982), que se preparó agregando 6.5 gr de cloruro de cesio (Sigma) por cada 4.5 ml de solución de plásmidos y 0.1 ml de EDTA 0.2 M; se añadieron 0.625 ml de tris-HCl (pH 8.4) y el mismo volumen de tris-HCl (pH 9.5), ambos a una concentración de 1 M, 0.25 ml de sarkosil al 20% y 0.4 ml de bromuro de etidio a una concentración de 10 mg/ml. Al tubo de la centrifuga (rotor SW 50 de la centrifuga Beckman) se le añadió aceite de parafina, evitando que quedaran burbujas en el mismo, y se centrifugó a 45000 rpm de 24 a 36 horas. La banda conteniendo a los plásmidos se recolectó por introducción de una aguja hipodérmica en el sitio donde ésta se encontraba. Se midió el volumen de la misma, y se le añadió un volumen de agua y 2.5 volúmenes de etanol. Se dejó precipitar al menos una hora a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 10 min (rotor HB-4, centrifuga Sorvall). El botón se resuspendió en NaCl 6 mM, tris-HCl (pH 7.5) 6 mM y EDTA 0.2 mM (6,6,0.2) en un volumen final de 5 ml., se añadieron 0.5 ml de tris-HCl (pH 9.5), 0.3 ml de cloruro de litio 8 M, 0.2 ml de sarkosil al 10% y se mezcló suavemente. Se realizaron extracciones con fenol-agua y cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 recuperándose la fase acuosa, la cual se precipitó con 2.5 ml de etanol al menos una hora a -20°C. Después de ese tiempo se centrifugó a 12000 g (rotor HB-4, centrifuga Sorvall) y el botón de DNA se resuspendió en 6,6,0.2.

La muestra se mantuvo a -20°C hasta el momento de ser utilizada.

5.4) Extracción de ácidos nucleicos de condilomas.

Los ácidos nucleicos de los condilomas fueron purificados de acuerdo con un método modificado de Kieg et al. (1983).

5.4.1) Purificación de ácidos nucleicos de las células de los pacientes.

Las biopsias fueron colocadas en nitrógeno líquido o en hielo seco, inmediatamente después de ser extraídas de la paciente, para fijarlas provocando la menor alteración posible al tejido. La extracción se realizó mediante una técnica modificada de Kieg, en la cual la muestra de tejido fue pulverizada en un mortero con hielo seco agregándose 5 ml de fenol saturado en agua con hidroxiquinoleína y acetato de potasio 0.3 M a pH 7.5, y 5 ml de una segunda solución de SDS 0.5%, EDTA 5 mM y acetato de potasio 0.3 M, por cada 0.5 gr de tejido. Se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, y se centrifugó la muestra, para ser recolectada la fase acuosa; a esta fase se le adicionó un volumen de isopropanol para precipitar en frío. La muestra fue centrifugada de nueva cuenta y el sobrenadante decantado. La pastilla conteniendo DNA y RNA, se resuspendió en 200 μl de agua estéril.

5.4.2) Separación de RNA y DNA.

A la muestra de DNA y RNA resuspendida en agua se le adicionó un volumen de cloruro de litio 4 M y se dejó precipitar 4 hrs. a 4°C. Se centrifugó a 12000 g por 20 min (rotor SS-34, centrifuga Sorvall). La pastilla, que contiene un exceso de RNA, se lavó con etanol al 70% y se le agregó cloruro de magnesio 5 mM. y 20 µg/ml de DNasa (Sigma). Después de 20 min de incubación, se frenó la digestión con EDTA 5 mM y se adicionaron 2.5 volúmenes de etanol al 70% para hacer un lavado, y por último, se resuspendió en 6,6,0.2. Del sobrenadante de la primera centrifugación se precipitó el DNA con 0.6 volúmenes de isopropanol o bien 2 de etanol, mismo que se resuspendió en 6,6,0.2. Ambas soluciones se mantuvieron a -20°C hasta el momento de ser utilizadas.

5.5) Cuantificación de Ácidos nucleicos.

La cuantificación se efectuó siguiendo los métodos descritos por Maniatis et al (1982). El primero consiste en espectrofotometría a 260 nm de longitud, en base a la relación: 1 OD=50 µg/ml de DNA de doble cadena. La relación entre las lecturas a 260 y 280 nm se utilizó para determinar impurezas por proteína, considerándose pura una muestra con índice igual o mayor de 1.8 para DNA y 2.0 para RNA. El segundo método se basa en electroforesis, en la que se comparó un volumen conocido de la muestra de concentración desconocida y con diluciones sucesivas de una muestra de concentración conocida. El gel se tiñó con bromuro de

etidio y se expuso en un transiluminador de luz ultravioleta a 260 nm de longitud.

5.6) Electroforesis de ácidos nucleicos.

La electroforesis de ácidos nucleicos se llevó a cabo en cámaras horizontales, utilizando geles de agarosa (tipo 1, Sigma) al 0.8%. Las muestras se corrieron adicionándoles 1/5 parte de amortiguador de muestra (azul de bromofenol 0.25%, xilen-cianol 0.25%, glicerol 30% en H₂O). Como amortiguador de corrida se utilizó TBE (tris-borato 0.89 M, EDTA 0.002 M) o TAE (tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.001 M). Los corrimientos se efectuaron aplicando un voltaje de 80-100 V. La visualización de los ácidos nucleicos se realizó adicionando bromuro de etidio 1 µg/ml e irradiando el gel en un transiluminador de luz ultravioleta a 260 nm (Southern 1980).

5.7) Desinserción de las sondas a partir del vector.

La desinserción se realizó digiriendo con endonucleasas de restricción el plásmido con el inserto en los sitios señalados en los mapas (figs. 3 y 4). Se corrió un gel de agarosa al 0.8%. La separación del DNA del gel de agarosa se realizó de acuerdo con el método de Birvitz et al. (1980) mediante el cual, una vez localizada la banda en el gel, con una lámpara de luz UV de onda

larga (300 nm), se procedió a hacer una incisión con un bisturí exactamente en frente de la banda. En esta abertura se colocaron un pedazo de papel Whatman 3MM y una pieza de membrana de diálisis sencilla detrás de éste. Una vez cerrada la abertura se continuó la electroforesis hasta que la banda migró al papel. Tanto el papel Whatman como la membrana fueron doblados y colocados en un tubo de polipropileno de 400 µl con un orificio en la parte inferior, y este a su vez dentro de otro tubo de 1.5 ml. Se centrifugaron los tubos tres veces a 12000 g en una microfuga (Eppendorf) agregando en cada centrifugación 100 µl de un amortiguador de elución (NaCl 0.2 M, Tris-HCl pH 7.6 50 mM, EDTA 1mM y SDS 0.1%) al tubo de 400 µl, recuperando el eluido después de cada una. Se realizaron extracciones con fenol, fenol-cloroformo y cloroformo; el DNA se precipitó con etanol a -20°C y fue resuspendido en 100 µl de H₂O o TE.

5.B) Digestión con endonucleasas de restricción.

Se utilizaron las endonucleasas Eco RI, Bam HI, Bgl II, Hind III y Pst I de Bethesda Research Laboratories (BRL, Catálogo 1987). Se utilizaron dos diferentes amortiguadores de digestión, cada uno de diferente fuerza iónica. Para las tres primeras enzimas se utilizó un amortiguador de gran fuerza iónica (tris-HCl pH 8.0 50 mM, MgCl 10 mM, NaCl 100 mM), mientras que para las otras dos se utilizó un amortiguador de fuerza iónica mediana (tris-HCl pH 8.0 50 mM, MgCl 10 mM, NaCl 50 mM) (BRL buffer chart). Se preparó una mezcla de digestión conteniendo la

concentración de DNA a digerir, el amortiguador de digestión apropiado (1 X) y de 1 a 3 unidades de enzima por μg de DNA. La incubación se llevó a cabo al menos durante 4 hrs. a 37°C para las primeras cuatro enzimas, y a 30°C para Pst I. Las reacciones fueron detenidas con amortiguador de muestra (1 X) (Maniatis et al. 1982).

5.9) Hibridación en punto y Southern.

Los métodos de hibridación empleados se basan en la desnaturalización del DNA, su inmovilización en filtros de nitrocelulosa, e hibridación con sondas marcadas (Noyes y Stark 1975). El primero permite detectar la presencia del virus, mientras que, por el segundo, se pueden detectar rearrreglos genéticos de éste en el DNA celular, así como su estado físico (Southern 1975).

5.9.1) Hibridación en punto.

El filtro de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell BA 85) se hidrató en acetato de amonio 1 M o bien en SSC 20X (NaCl 3 M, citrato de sodio 0.3 M). La muestra, previamente desnaturalizada, fue aplicada al filtro utilizando la cámara Bio-dot (Bio-rad). El filtro se horneó a 80°C y a una presión de 20 mm Hg de 2 a 4 hrs.

5.9.2) Hibridación tipo Southern.

Las muestras a hibridar se corrieron por electroforesis en un gel de agarosa (tipo 1) al 0.8% de 0.8 cm de grosor y en amortiguador de corrida TBE o TAE (1 X) (Southern 1980). La transferencia del DNA a los filtros de nitrocelulosa se realizó por el método de Southern (1975). El DNA en el gel se desnaturalizó sometiéndolo a un tratamiento en HCl 0.25 N durante 15 min., dos veces. Posteriormente, el gel se lavó en agua destilada y se puso en presencia de NaOH 0.5 N y NaCl 1M durante 15 min. dos veces. Nuevamente se enjuagó en agua destilada, neutralizando la base con un tratamiento en tris-HCl 0.5 M (pH 7.4) y NaCl 3 M, dos veces. La transferencia del gel al filtro se hizo montando un dispositivo que consiste en poner el gel en contacto con el filtro y permitir la transferencia por arrastre de buffer salino (SSC 10 X) de 12 a 24 hrs. El filtro se horneó de 2 a 4 hrs. a una presión de 20 mm Hg a 80°C.

5.9.3) Marcaje de las sondas.

El marcaje con nucleótidos radiactivos [P] o biotinilados se realizó utilizando los juegos para "Nick translation" de Bethesda Research Laboratories (BRL, Catalogue no. B2396A) y Amersham (Amersham International, 1984); también se preparó un juego utilizando nucleótidos fríos y enzimas de Sigma. El marcaje se realizó agregando en un tubo las soluciones contenidas en el

juego: soluciones A1-A5 (dNTPs no marcados 0.2 mM en tris-HCl 500 mM (pH 7.8), MgCl₂ 50 mM, 2-mercaptoetanol y 100 µg/ml de albúmina de suero de bovino (BSA)), 1 µg del DNA a marcar, 0.1 mM del nucleótido biotinilado o 25 uCi del radiactivo, solución C (0.4 unidades/µl de DNA Polimerasa 1, tris-HCl 50 mM (pH 7.5), acetato de magnesio 5 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 0.1 mM, glicerol 50% y BSA libre de nucleasas 100 µg/ml. La mezcla se incubó a 15°C por 90 min. y la reacción se paró con la solución D (EDTA 300 mM pH 8.0) (Rigby et al. 1977). El dUTP biotinilado se adquirió de BRL y [³²P]dATP fue comprado a Amersham. Para separar el DNA marcado de los nucleótidos libres, la mezcla se pasó por una columna de Sephadex G-50 equilibrada con SSC 1X-SDS 0.1%, preparada en una jeringa de 1 ml de acuerdo con el método de Maniatis et al. (1982). La muestra de DNA se aplicó a la columna y centrifugó a 1,600 g por 4 min (rotor HB-4, centrifuga Sorvall), siendo el DNA marcado colectado en el eluido, mientras que los nucleótidos no incorporados permanecen en la columna. Se trabajó con una radiactividad específica de 1x10⁶ cpm/µg de DNA, misma que se determinó en un contador de centelleo líquido (Beckman). Todos los pasos del marcaje con [³²P] se realizaron utilizando un mandil de plomo y trabajando detrás de una mampara de lucita en un cuarto destinado para tal efecto.

5.9.4) Condiciones de hibridación.

El filtro se colocó en un amortiguador de prehibridación (10

ml/100 cm²) en una bolsa de polietileno sellada, de 2 a 4 hrs. Los componentes del amortiguador variaron dependiendo de las condiciones de hibridación (apêndice 7.1). En condiciones estrictas (T_m-10) êste se preparó con formamida desionizada al 45%, SSC 5X, Denhart 5X, fosfato de sodio (pH 6.5) 25 mM y DNA de arenque (Sigma) 500 µg/ml, siendo la incubación a 42°C. En condiciones relajadas (T_m-40), la formamida se agregó a una concentración del 10% y la incubación se llevó a cabo a 35°C. Una vez prehibridado el filtro, el amortiguador de prehibridación fue extraído de la bolsa, y se agregó el amortiguador de hibridación, el cual presenta la misma concentración de formamida, SSC, fosfato de sodio y DNA de arenque que el amortiguador de prehibridación, pero el Denhart se adicionó en una concentración 1X, además de adicionársele dextrán sulfato de sodio al 10% y de 100 a 400 ng de la sonda marcada, la cual fue previamente calentada a 95°C por 5 min. para desnaturalizar, y enfriada a -70°C en etanol-hielo seco por 5 min. Se incubó a 35°C en condiciones relajadas y a 42°C en condiciones estrictas, por el tiempo requerido (Apêndice 7.2). Posteriormente se realizaron lavados del filtro con 250 ml de solución de SSC 2X-SDS 0.1%, SSC 0.2X-SDS 0.1% ambos a temperatura ambiente, con SSC 0.16X-SDS 0.1% a 65°C en condiciones estrictas y a 32°C en condiciones relajadas, y finalmente con SSC 2X-SDS 0.1% a temperatura ambiente. Todos los lavados se llevaron a cabo por duplicado por 3 min, con excepción de aquél con SSC 0.16X-SDS 0.1% donde cada lavado duró 15 min.

5.9.5) Detección del DNA biotinilado en nitrocelulosa.

Para la visualización de sondas biotiniladas se siguió el método desarrollado por Leary et al. (1983). Primeramente se lavó el filtro en el amortiguador 1 (tris-HCl 0.1 M (pH 7.5), MgCl₂ 2 mM, tritón X-100 0.05% (v/v)), y se incubó por 20 min. a 42°C en el amortiguador 2 (albúmina de suero bovino 3% (p/v) en el amortiguador 1) precalentado. Cuando la hidratación no fue uniforme se le dieron 20 min. más a 42°C. Se dejó secar a 80°C en vacío (20 mm Hg) de 10 a 20 min. El filtro se rehidrató en el amortiguador 2 por 10 min. Para detección, se colocó el filtro en presencia de avidina o estreptavidina 2 µg/ml en el amortiguador 1 (3 ml/100 cm² de nitrocelulosa) por 10 min. Se hicieron tres lavados de 3 min. cada uno en el amortiguador 1, y se incubó el filtro por 10 min. en presencia del polímero de biotina-fosfatasa alcalina 1 µg/ml en el amortiguador 1 (3 ml/100cm² de nitrocelulosa). Se realizaron entonces lavados con el amortiguador 1 y con el amortiguador 3 (tris-HCl 0.1 M (pH 9.5), NaCl 0.1 M, MgCl₂ 50 mM). La visualización se llevo a cabo colocando el filtro en presencia de colorante (2.4 mg nitroazul de tetrazolio y 1.2 mg de 5-bromo-4-cloro-3-indol fosfato en 7.5 ml del amortiguador 3 por cada 100 cm² de nitrocelulosa). Posteriormente se lavó el filtro en tris-HCl 20 mM (pH 7.5) y EDTA 5 mM, dejando secar en vacío (20 mm Hg) a 80°C por 1 o 2 min.

5.9.6) Síntesis del polímero de biotina-fosfatasa alcalina.

La síntesis de este polímero se hizo de acuerdo con el método de Leary et al. (1983). Todo el procedimiento se llevó a cabo a 4°C. Primero se agregaron 5 µl de solución de disuccinimidil suberato (DS) 5 mg/ml a 1 ml de solución de fosfatasa alcalina (FA) 1 mg/ml en NMZT pH 7.6 (NaCl 3 M, MgCl 1 mM, ZnCl 0.1 mM, trietanolamina 30 mM), mezclando suavemente por 1 a 2 min. Se agregaron entonces 5 µl más de DS y se agitó por 40 min. Se añadieron 10 µl de cadaverina 0.1 mg/ml en NMZT y se dejó agitando 20 min, repitiendo esta operación tres veces más, y haciéndolo una cuarta vez, pero agregando 30 µl de cadaverina/ml de reacción. Finalmente se adicionaron 2 µl de cadaverina no diluida y se agitó una hora más. Se dializó contra NMZT por 2 hrs., cuatro veces. Se agregaron 10 µl de solución de biotina (20 mg/ml) por cada mg de FA y se dejó agitando por 2 hrs. Se dializó contra NMZT. Se agregó azida de sodio al 0.2% y se transfirió la solución a un tubo de polipropileno de 1.5 ml.

5.9.7) Autorradiografía

Se utilizaron placas para radiografía (Kodak X-Omat AR) que se expusieron en presencia del filtro de 2 a 3 días. Esto se realizó colocando ambos en un cassette para placas radiográficas, a -70°C, en un ultracongelador (Revco). Las placas se revelaron

exponiéndolas 15 min. en revelador Foto Flow (Kodak), 5 min. en H₂O y 10 min. en fijador (Kodak).

6) RESULTADOS

6.1) Hibridación en punto con HPVs 6, 11, 16 y 18.

Se realizaron cuatro ensayos de hibridación en punto para DNA y uno para RNA. Para los primetos tres, y para el de RNA, las sondas se marcaron con biotina, mientras que para el otro con [³²P].

De 44 pacientes se tomaron un total de 58 muestras de las cuales, 44 se ensayaron para DNA y 14 para RNA. Seis muestras fueron estudiadas en ambos tipos de ensayos.

Del total de muestras, 39 fueron de mujeres, correspondiendo 17 a cérvix y 22 a vulva, siendo un total de 29 condilomas, dos NIC I y dos NIC III. De hombres se analizaron nueve muestras de condilomas, cuatro de pene, tres de meato urinario, una de ano y una de glande.

6.1.1) Hibridación para DNA.

Las hibridaciones con DNA se realizaron utilizando como sondas los cuatro tipos virales, desinsertados del vector (pBR322), cada una en filtros separados. Todas las hibridaciones

fueron en condiciones estrictas [Tm-12], y fueron realizadas utilizando una sonda a la vez. Por último, se utilizaron todas las sondas en conjunto pero a Tm-40 para tener condiciones relajadas a fin de poder detectar la presencia de algún otro tipo viral.

No. muestra	Diagnóstico clínico	HPVs	T
43	NIC III de cérvix		
41	NIC I de cérvix		
3	Condiloma acuminado de vulva		
34	Condiloma acuminado de glande		
31	Condiloma acuminado de meato		
31	Condiloma acuminado de meato		
1	Condiloma acuminado de cérvix		
	Controles positivos		
	Controles negativos		

Fig. 5. Hibridación en punto del filtro no. 1 con HPVs 6, 11, 16 y 18 en condiciones estrictas, y con todos los tipos virales a la vez (T) en condiciones relajadas. Las sondas se marcaron con biotina. Se pusieron 10 µg de DNA por punto.

Como se mencionó con anterioridad, los ensayos de hibridación en punto con DNA se realizaron en cinco filtros diferentes. La figura 5 muestra los resultados obtenidos en el primer filtro. Como puede apreciarse, la mayoría de los casos resultaron positivos para HPV 6 u 11, siendo todos positivos para uno u otro HPV. Esto se confirmó además al hibridar con los cuatros tipos virales a la vez, ya que como puede observarse en la misma figura, todos resultaron positivos. Los resultados obtenidos en los otros filtros no se muestran. Asimismo, se observa que en el caso de pacientes con dos biopsias, una de cervicecix y una de vulva, los resultados de presencia y ausencia del virus, coinciden.

El análisis de los resultados de los 5 filtros, para cada tipo de lesión, se muestra en la tabla III. Se observa una predominancia del HPV 6 en la totalidad de los casos, seguido de HPV 11 y HPV 18. Cabe señalar que, dado el tamaño de algunas de las muestras (la mayoría de las veces su peso fue inferior a 0.1 gr), la cantidad de DNA que se extrajo de las mismas fue también muy pequeña, por lo que no se pudieron ensayar todos los casos para todos los tipos de sondas virales. Esto se debe a que los filtros en los que se usó sondas marcadas con biotina solo pueden ser utilizados una vez; lo mismo no ocurrió para las sondas marcadas con [32 P], ya que los filtros pueden ser lavados y reutilizados varias veces.

Tabla III. Análisis de los resultados obtenidos por los ensayos de hibridación en punto con DNA. Las muestras 1-29 corresponden a condilomas acuminado y vegetante; muestras 30-38 a condilomas acuminado y vegetante de hombre; muestra 39 a condiloma plano de mujer; muestra 40 a prurito vulvar; muestras 41 y 42 a neoplasia intraepitelial cervical (NIC) I de mujer y las muestras 43 y 44 a NIC III de mujer.

No. muestra	HPVs				No. muestra	HPVs			
	6	11	16	18		6	11	16	18
1	+	+	-	-	23	+	+	NE	NE
2	+	+	-	-	24	-	+	-	-
3	+	+	-	+	25	+	+	-	-
4	+	-	NE	NE	26	+	-	-	-
5	+	-	-	-	27	+	-	-	-
6	-	+	NE	NE	28	+	-	-	+
7	+	+	+	-	29	+	-	-	-
8	+	+	NE	NE	30	+	+	-	+
9	+	-	-	-	31	+	+	-	+
10	+	-	-	-	32	+	+	-	+
11	-	+	-	-	33	+	+	-	-
12	+	NE	NE	NE	34	+	+	-	+
13	+	NE	NE	NE	35	+	+	-	-
14	-	-	-	+	36	+	-	NE	NE
15	+	NE	NE	NE	37	+	+	NE	NE
16	-	-	-	-	38	+	+	-	+
17	+	NE	NE	NE	39	-	-	-	+
18	-	-	-	-	40	-	-	NE	NE
19	+	-	NE	NE	41	+	+	-	+
20	+	NE	NE	NE	42	+	-	-	-
21	+	+	NE	NE	43	+	-	-	+
22	+	+	-	-	44	+	+	-	-

Abreviaturas: + = positivo; - = negativo; NE = no estudiado.

En la tabla IV se muestra el porcentaje de casos positivos para los diferentes tipos virales en condilomas acuminado y vegetante, condiloma plano y NIC I-III. Puede apreciarse que en el primero y último tipo de lesiones existe una predominancia del HPV 6 (que en NIC I-III llega a ser hasta de 100%), seguido de HPV 11 y, en menor proporción de HPV 18; mientras que para HPV 16 la incidencia es muy baja o nula. Para el caso del condiloma plano, dado que solo se conto con un caso, no se puede generalizar en los resultados.

Tabla IV. Porcentaje de casos positivos para los HPVs en las diferentes lesiones analizadas por hibridación en punto (casos positivos / total).

Diagnóstico	HPVs			
	6	11	16	18
Condilomas acuminado y vegetante	84.2% (32/38)	57.5% (19/33)	4% (1/25)	33.3% (8/24)
Condiloma plano	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)
Neoplasia intraepitelial cervical I-III	100% (4/4)	50% (2/4)	0% (0/4)	50% (2/4)

Como se observa en la tabla V, al comparar los casos de condilomas tanto para hombre como para mujer, las tendencias mencionadas anteriormente, sobre los tipos virales presentes, se mantienen. Para todos los tipos de HPVs, con excepción del HPV 16, se puede apreciar que la incidencia resulta mayor en hombres que en mujeres; esta diferencia resulta particularmente marcada para el HPV 18.

Tabla V. Porcentaje de condilomas acuminado y vegetante positivos para HPV's en mujer y hombre (casos positivos / total).

	HPVs			
	6	11	16	18
Mujer	79.3% (23/29)	45.8% (11/24)	5.5% (1/18)	16.6% (3/18)
Hombre	100% (9/9)	88.8% (8/9)	0% (0/7)	71.4% (5/7)

Tabla VI. Porcentaje de condilomas acuminado y vegetante positivos para HPV's en muestras de cérvix y vulva (casos positivos / total).

	HPVs			
	6	11	16	18
Cérvix	80% (8/10)	42.8% (3/7)	20% (1/5)	40% (2/5)
Vulva	82.3% (14/17)	40% (6/15)	0% (0/11)	9% (1/11)

Al comparar los casos de condiloma en cérvix y vulva se observa en la tabla VI que las proporciones de incidencia de los HPV's se mantienen más o menos constantes, quedando el HPV 6 como el más común, seguido de los tipos 11, 18 y 16 en respectivo orden de frecuencia.

En la tabla VII se muestra el número de casos de condilomas, que resultaron positivos para diversas combinaciones de los HPVs, observándose una mayor tendencia a la infección múltiple en hombres que en mujeres. Asimismo, aunque la infección simultánea de HPV 6 y HPV 11 es la más común, también se encontraron otras asociaciones, principalmente entre HPVs 6 y 11 con HPV 18, y con mayor frecuencia en hombres que en mujeres.

Al comparar el número de casos positivos para infección con uno o más tipos virales, como se aprecia en la tabla VIII, se encontró en mujeres una predominancia en la infección con uno o dos virus, mientras que en hombres no se encontró infección con un solo tipo viral, y si se detectó una mayor proporción de infección múltiple, sobre todo con tres tipos de HPVs

Los casos de NIC estudiados (I y III) y la frecuencia de aparición de los diversos HPVs en los mismos, se muestran en la tabla IX. Al igual que para los casos de condiloma, se aprecia una predominancia de HPV 6 seguida de HPVs 11 y 18. Los datos encontrados en condiloma al respecto de la alta incidencia de HPV 18, son congruentes con lo encontrado en los casos de NIC I y III, donde se observa una predominancia en la incidencia de HPV 18 sobre HPV 16.

Tabla VII. Porcentajes de casos positivos para diferentes combinaciones de HPVs en mujer y hombre (casos positivos / total).

	Combinaciones de HPVs							
	6 y 11	6 y 16	6 y 18	11 y 16	11 y 18	16 y 18	6, 11 y 16	6, 11 y 18
Mujer	31.8% (7/22)	6.3% (1/16)	16.6% (2/12)	6.2% (1/16)	6.2% (1/16)	0% (0/16)	20% (1/5)	9.1% (1/11)
Hombre	88.8% (8/9)	0% (0/7)	71.4% (5/7)	0% (0/7)	71.4% (5/7)	0% (0/7)	0% (0/7)	71.4% (5/7)

Tabla VIII. Porcentaje de casos positivos para uno o más tipos virales en mujeres y hombres (casos positivos / total).

	0	1	2	3	4
Mujer	8.7% (2/23)	52.1% (12/23)	26% (6/23)	13% (3/23)	0% (0/23)
Hombre	0% (0/7)	0% (0/7)	28.5% (2/7)	71.4% (5/7)	0% (0/7)

Tabla IX. Casos de neoplasia intraepitelial cervical (NIC I-III) positivos para los diferentes tipos virales (casos positivos / total).

	HPVs			
	6	11	16	18
NIC I	2/2	1/2	0/2	1/2
NIC III	2/2	1/2	0/2	1/2

6.1.2) Hibridación de RNA.

La hibridación con RNA se realizó para los HPV's 6 y 11, siendo éstos casos de condiloma y condiloma plano; mientras que un caso de NIC I solo se hibridó para HPV 16.

En la tabla X se muestra el análisis de los resultados obtenidos en esta hibridación. De trece muestras estudiadas, todas fueron positivas para HPV 6, mientras que solo tres fueron positivas para HPV 11 (23%), apreciándose una mayor expresión del primer virus. En tres muestras se obtuvo respuesta positiva para

HPVs 6 y 11; la única muestra para HPV 16 resultó positiva.

Tabla X. Análisis de los resultados obtenidos por el ensayo de hibridación en punto con RNA. Las primeras doce muestras corresponden a condilomas acuminado y vegetante; la muestra 41 a una neoplasia intraepitelial cervical (NIC I); y la muestra 45 a condiloma plano.

No. muestra	6	11	16	18
36 p	+	-	NE	NE
3 v	+	-	NE	NE
4 cx	+	+	NE	NE
5 v	+	-	NE	NE
6 cx	+	-	NE	NE
10 v	+	-	NE	NE
46 v	+	-	NE	NE
47 v	+	-	NE	NE
48 v	+	-	NE	NE
49 v	+	-	NE	NE
50 v	+	+	NE	NE
51 cx	+	-	NE	NE
41 cx	NE	NE	+	NE
45 v	+	+	NE	NE

Abreviaturas: + = positivo; - = negativo; NE = no estudiado; cx = cérvix; v = vulva; p = pene

La tabla XI muestra una comparación entre los resultados obtenidos mediante las hibridaciones con DNA y RNA para las muestras que se analizaron para ambos casos. De cinco casos de condiloma positivos para HPV 6 con hibridación con DNA, todos fueron positivos para HPV 6 con hibridación con RNA, mientras que

uno más que fue positivo también para RNA, no lo fue para DNA. De seis casos estudiados para HPV 11, dos fueron positivos para DNA y negativos para RNA, mientras que otro fue positivo para RNA y negativo para DNA; el resto coincidieron en negatividad.

Tabla XI. Comparación entre los resultados obtenidos para los casos ensayados tanto para DNA como para RNA por hibridación en punto.

No. muestra	HPV 6		HPV 11	
	DNA	RNA	DNA	RNA
3	+	+	+	-
4	+	+	-	+
5	+	+	-	-
6	-	+	+	-
10	+	+	-	-
36	+	+	-	-

6.2) Hibridación tipo Southern con HPVs 6, 11, 16 y 18.

Se realizaron cinco ensayos tipo Southern de los cuales, los dos primeros fueron realizados con DNA de muestras previamente analizadas por hibridación en punto (muestras 5, 7, 11, 18, 22, 24, y 44), mientras que para los tres restantes se utilizó DNA de nuevos pacientes, siendo 12 de mujeres y una hombre. Las muestras de mujer fueron: cuatro condilomas de cérvix, cuatro de vulva y uno de uretra; tres condilomas planos, uno de vulva, uno de cérvix y uno de clitoris; cuatro NIC III, dos de vejiga, uno de vulva y uno de cérvix; la muestra de hombre fue un condiloma de

meato urinario.

Todas las sondas utilizadas fueron marcadas con [α - 32 P]ATP (1×10^6 cpm/ μ g DNA).

6.2.1) Southern de filtros con muestras ensayadas por hibridación en punto.

Se colocaron siete muestras, con 1.2-2.0 μ g por carril, cada una de las cuales se digirió con las endonucleasas Bam HI, Bgl II y Pst I, además de ponerse una muestra sin digerir.

Estos filtros fueron hibridados con HPV 6 en condiciones estrictas [Tm-20]. El único caso que dió señal positiva fue el 7, que en el análisis previo en punto había resultado positivo para HPV 6. Como puede apreciarse en la figura 6, la señal positiva muestra un estado físico episómico o no integrado, dado porque las bandas obtenidas coinciden con el peso molecular del virus desinsertado.

La hibridación con HPV 11 y HPV 18 en condiciones relajadas [Tm-40] para estos dos filtros no dieron señal positiva.

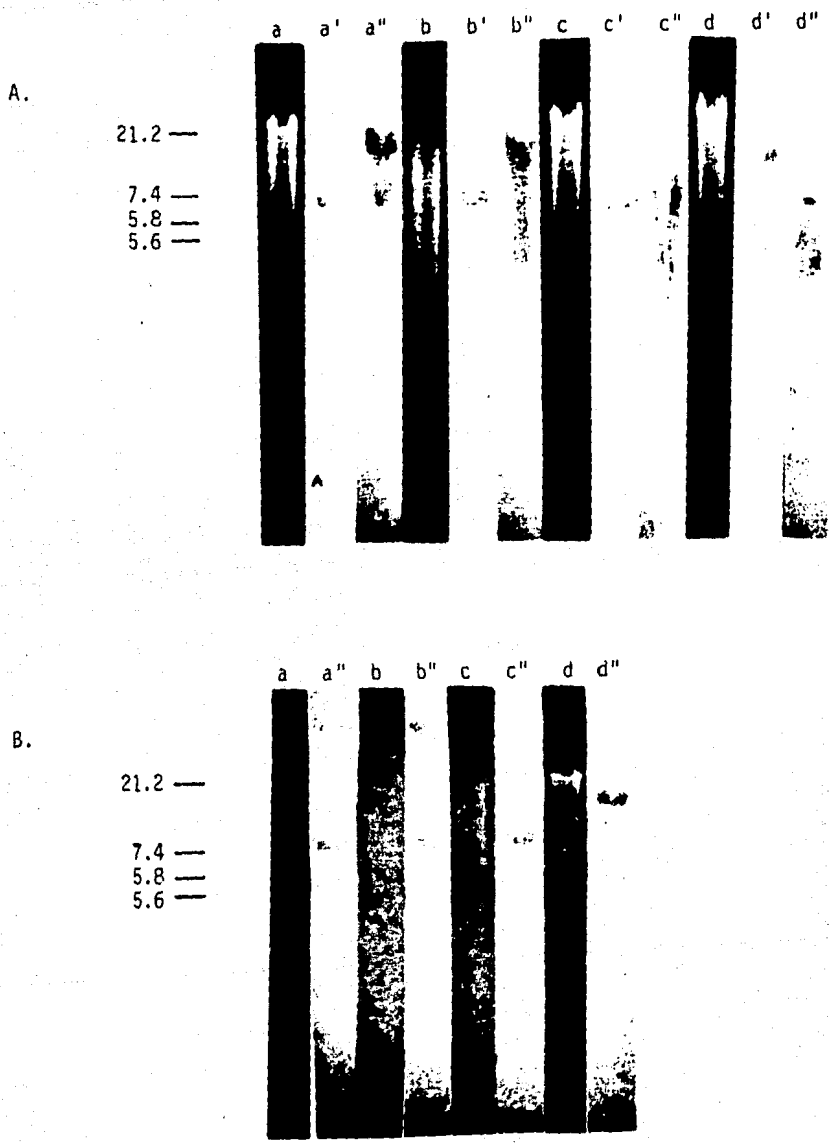


Fig. 6. Resultados de la hibridación tipo Southern con HPV 6 (TM-12) y HPV 16 (TM-40). A. Condiloma de cérvix, muestra no. 7 (2 µg por carril); B. Vulvitis condilomatosa, muestra no. 5 (1.2 µg por carril). a, b, c y d: geles teñidos con bromuro de etidio de DNA digerido en el siguiente orden: Bam HI, Bgl II, Pst I y sin digerir; a', b', c' y d'. autorradiografías correspondientes a cada muestra, de la hibridación con HPV 6; a'', b'', c'' y d''. autorradiografías de la hibridación con HPV 16. Se señalan los pesos moleculares (en Kpb) de los fragmentos de DNA de fago lambda digerido con Eco RI.

Con HPV 16 en condiciones relajadas [Tm-40], se obtuvo positividad en cuatro casos, mismos que por hibridación en punto habían resultado positivos para uno u otro HPV. Los patrones de bandeo en las señales positivas resultaron ser diferentes de lo esperado, migrando a diversas alturas, dependiendo de la enzima utilizada en su digestión. En el caso 5, se obtuvo un bandeo similar al del caso 7 con HPV 6, mientras que este último caso para HPV 16 mostró bandeo diferente como se aprecia en la figura 6.

6.2.2) Southern con muestras no probadas por hibridación en punto.

Los tres filtros contuvieron 17 muestras de condilomas (10 ug por carril), cada una digerida con Bam HI y Bgl II y sin digerir.

Los filtros fueron hibridados con HPV 18 en condiciones relajadas [Tm-40]. Aunque resultaron positivos los 17 casos, no se apreciaron bandas definidas en todas las muestras.

En 12 casos, al digerir con Bam HI, la señal no se localizó en la zona de peso molecular correspondiente al virus como monómero; pero en todos se detectó a esta altura al utilizar la enzima Bgl II, como se muestra en la figura 7. En un solo caso, la enzima Bam HI digirió el virus y la banda migró a la altura del marcador viral.

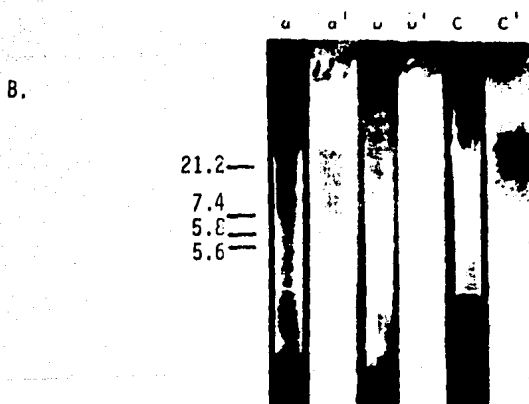
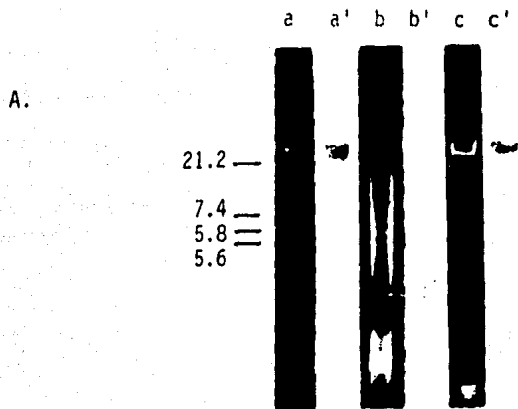


Fig. 7. Resultados de la hibridación tipo Southern con HPV 18 (Tm-40). A y B. Condilomas de cérvix muestras 45 y 46 respectivamente. a y a'. gel teñido con bromuro de etidio y autorradiografía del DNA de condiloma digerido con Bam HI (10 μ g), b y b'. gel y autorradiografía del DNA digerido con Bgl II (10 μ g), c y c'. gel y autorradiografía del DNA sin digerir. A la izquierda se señalan los pesos moleculares (en Kpb) de los fragmentos de DNA de fago lambda digerido con Eco RI.

6.3) Hibridación tipo Southern con el oncogen v-MYC.

Se realizó un ensayo de hibridación con v-MYC en los primeros dos filtros estudiados para HPV. El oncogen viral fue marcado con biotina, y la hibridación se llevó a cabo en condiciones estrictas [Tm-12]. Dicha prueba resultó negativa, lo que es explicable en base a la falta de sensibilidad del ensayo, ya que en lugar de diez microgramos de DNA, se tenían 2 y 1.5 ug por carril.

6.4) Hibridación cruzada con HPVs 6, 11, 16 y 18.

Se realizó un ensayo de hibridación cruzada usando como sondas los diferentes tipos virales marcados con [32 P] y a ellos mismos como blanco.

Los tipos 6 y 11 se ensayaron en condiciones relajadas [Tm-40], obteniéndose resultados positivos en todos los casos. Los HPVs 16 y 18 se hibridaron en condiciones tanto estrictas [Tm-10] como relajadas [Tm-40]. Como puede verse en la figura 8, en condiciones relajadas todos resultaron positivos, mientras que en condiciones de alta estringencia, sólomente hibridó el virus correspondiente.

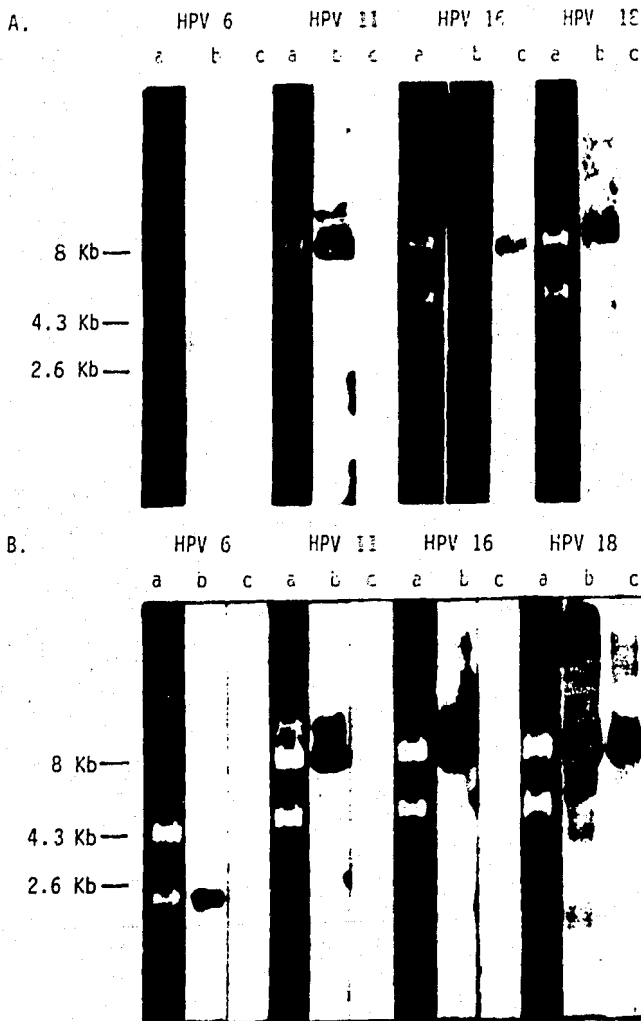


Fig. 8. Resultados de la hibridación cruzada con HPV 16 (A) y HPV 18 (B). a. Gel teñido con bromuro de etidio (1 $\mu\text{g/ml}$) y visto con luz UV, del plásmido con el inserto correspondiente a la sonda viral utilizada (digestiones: HPV 6 con Eco R1 y Bam H1, HPV 11 con Bam Hi, HPV 16 con Bam H1 y HPV 18 con Eco R1) (Ver fig. 3). b. Autorradiografía en condiciones relajadas ($T_m=20$). c. Autorradiografía en condiciones estrictas ($T_m=12$). Se pusieron 2 μg de DNA por carril.

7) DISCUSION

En base a nuestras evidencias experimentales podemos decir que el virus del papiloma humano se encuentra asociado a las lesiones benignas en frecuencias definidas, con una alta predominancia del HPV 6. Esto coincide con lo publicado en otros países como Alemania, Kenya y Brasil (Dürst et al. 1983; Gissmann et al. 1983), donde se encontraron incidencias altas de este tipo viral, que junto con HPV 11, está presente en condilomas en un 90.9% de los casos.

Sin embargo para el caso de HPV 18 nuestros resultados indican una alta incidencia de este virus (33%) en comparación con la existente en otros países (5%) (Dürst et al. 1983). Con el fin de descartar la posibilidad de que estos datos se debieran a artefactos de la técnica, se realizó una hibridación cruzada entre los cuatros tipos de virus del papiloma que utilizamos como sondas: HPVs 6, 11, 16 y 18, observándose que en condiciones estrictas no existe hibridación cruzada.

Por tanto, consideramos que el HPV 18 es un tipo predominante en nuestra población, aunque no puede descartarse la posibilidad de error en el diagnóstico clínico de la lesión al confundir el condiloma convencional con el condiloma plano atípico. Por tanto, una confirmación posterior del diagnóstico

por medios histológicos sería lo adecuado. Cabe señalar que los resultados presentes son congruentes con los encontrados en CaCu por el M.C. Jaime Berumen (comunicación personal), puesto que detecta un 80% de incidencia de HPV 18 contra un 40% de HPV 16, siendo que mundialmente se ha encontrado tres veces más abundantemente el HPV 16 que el HPV 18 en CaCu.

Las tendencias observadas en cuanto a las frecuencias de presencia de los HPVs en las lesiones, son similares en las mujeres y en los hombres; sin embargo, en estos últimos se detectó una frecuencia de aparición de HPV 18 mayor que en las mujeres. Asimismo las lesiones en mujeres tendían a presentar en general una presencia doble de agentes infecciosos, mientras que en los hombres la tendencia fue la de presentar hasta tres agentes infecciosos por lesión. Esto parece indicar que existe una mayor susceptibilidad por parte de los hombres para la infección por uno o más virus; por otra parte, es probable que los individuos estudiados por nosotros presentaran hábitos higiénicos más deficientes o conductas sexuales más promiscuas que los de las mujeres estudiadas. Esto no puede afirmarse, debido al desconocimiento de los antecedentes de los casos estudiados, por lo que sería conveniente ampliar el tamaño de la muestra, auxiliada de una entrevista aplicada al paciente de manera más rigurosa. Es importante señalar que pese a este hallazgo de infección múltiple en hombres, el cáncer de pene es menos frecuente que el cáncer cervicecario-uterino (Parkin et al. 1984).

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Debe considerarse asimismo, que la muestra analizada por nosotros para hibridación en punto, proviene del Hospital Central Militar, en el que es de esperarse la asistencia de individuos de distintas regiones del país; por tanto, las frecuencias detectadas por nosotros no necesariamente pertenecen a una localidad específica.

Los ensayos para detección de la actividad viral realizados con RNA coinciden con los ensayos con DNA en la mayoría de los casos. Donde se encontró HPV 6, generalmente se detectó también su RNA, mientras que para HPV 11 en la mayoría de los casos no se encontró DNA en el respectivo ensayo o RNA en los casos positivos para DNA. En el caso donde se detectó RNA de HPV 6 pero no se encontró DNA en el ensayo correspondiente, se puede suponer que el virus no se encuentra en suficiente número de copias para ser detectado por el ensayo, pero que se encuentra transcribiendo gran cantidad de RNA que si fue posible visualizar. Lo mismo se puede decir del caso en que HPV 11 no fue detectado pero si su RNA. En los dos casos en que se observó el DNA de HPV 11 pero no su RNA, es posible que el virus no esté transcribiendo, que el transcrito sea de muy baja cantidad o que haya habido degradación durante la extracción, y que por ello sea no detectable. No se puede descartar la posibilidad de hibridaciones cruzadas en RNA, ya que varios genes de los HPV's presentan homología, como es el caso de los genes tardíos L1 y L2 que codifican para la cápside viral. Es muy posible detectar transcritos de estos genes en las lesiones condilomatosas (Syrjänen et al. 1986).

Con respecto a las hibridaciones tipo Southern de muestras previamente probadas por hibridación en punto con HPV 6 en condiciones estrictas, sólo se corroboró la presencia del virus en un caso. El hecho de que esto no ocurriera para los otros casos en que se había detectado positividad para este virus, puede deberse a una falta de sensibilidad del ensayo. Es bien conocido el hecho de que en hibridaciones tipo Southern con material radiactivo puede detectarse hasta una copia del virus cuando se aplican 10 ug de muestra por carril (Maniatis et al. 1982). En nuestro caso esto no ocurrió, ya que solo se pudieron aplicar de 1.2-2.0 ug de muestra por carril.

En relación a la falta de sensibilidad, creemos que la actividad de la DNA Polimerasa I fue baja, ya que en las condiciones descritas por BRL (Catálogo 1987) y por Maniatis et al. (1982), era de esperarse la obtención de una actividad específica de 1×10^6 cpm/ug de DNA, siendo que la actividad específica obtenida en nuestro marcaje osciló de 1×10^5 cpm a la mejor marca que fue de 4.7×10^5 cpm. La posibilidad de falla debido a una baja actividad de la DNAsa I se descartó al realizar ensayos de degradación, en los cuales se mostró la actividad adecuada de la enzima. Para alcanzar una alta sensibilidad en la prueba (hasta una copia del gene), se recomienda tener 1×10^6 cpm/ml en el buffer de incubación para la hibridación y 10 ug de DNA a probar. Nosotros utilizamos de 10 a 15 ml de nuestro amortiguador de reacción, dependiendo del tamaño de los filtros

(10 ml/100 cm según Maniatis et al. 1982), por lo que la actividad específica era diluida unas diez veces quedando en 1×10 cpm/ml. En este trabajo la cantidad de DNA a ensayar quedó determinada por el tamaño de la biopsia que era procesada. Una estrategia utilizada por nosotros para aumentar la sensibilidad, consistió en incrementar el Cot 1/2 de la hibridación con periodos de hasta tres días de incubación (ver apéndice 6.2).

Como se aprecia en la figura 7, el virus no se encuentra inserto en el genoma del hospedero, ya que la señal positiva en los carriles con enzima es más marcada a la altura del peso del virus que en el carril de DNA sin digerir, además de que solo se localiza una banda; si el virus estuviera integrado al genoma del hospedero sería de esperarse al menos dos bandas más, que al desinsertarse liberarían fragmentos del tamaño del virus y los fragmentos de unión del virus al DNA del hospedero. Por otra parte, en el carril sin enzima existe mayor cantidad de DNA producto de degradación inespecífica a la altura del peso molecular del marcador viral; si el virus se encontrara integrado al genoma celular, se esperaría que la señal de este carril se extendiera hasta la zona donde existe gran cantidad de DNA.

La presencia del virus en estado episómico como lo detecta el ensayo coincide con lo publicado previamente para este tipo de lesiones (Syrjänen et al. 1986). Se utilizó la enzima Bam HI que corta al genoma del virus en un solo sitio (Rando et al. 1986) por lo que se esperaba, que se detectara una banda a la altura del marcador viral, como en efecto ocurrió. Por otra parte, la

enzima Bgl II fue utilizada para corroborar la existencia de un sitio de corte en el genoma del virus; dicho sitio ha sido demostrado por ensayo, pero el análisis de la secuencia de nucleótidos no lo muestra (J. Lagóñez, comunicación personal). Así, el hecho de que la banda se encontrara a la altura del marcador de peso, correspondiente a la forma monomérica relajada del virus detectado por nosotros, demuestra la existencia de un sitio de corte para esta enzima debido quizá a una modificación en su secuencia de nucleótidos. La enzima Pst I se utilizó buscando polimorfismos en los virus detectados, ya que el HPV 6 presenta tres sitios de corte, por lo que, con la sonda utilizada por nosotros (clona Amp 21) (ver fig. 3), era de esperar el detectar dos bandas de bajo peso molecular del virus digerido. Esto se puede explicar ya que uno de estos sitios está comprendido en la zona de DNA clonada en nuestra sonda; sin embargo solo se detectó una banda a la altura del virus completo, por lo que suponemos que el virus presente en la muestra perdió sitios de restricción para Pst I, lo que ya ha sido reportado previamente (Gissmann et al. 1983).

El hecho de que no se detectara la presencia del virus en las hibridaciones en condiciones relajadas con HPV 11 y 18 obedece quizá a lo mencionado anteriormente a propósito de la falta de sensibilidad de la prueba. En el caso de la hibridación con HPV 16 realizada en las mismas condiciones, se encontró positividad en algunos casos. Esto puede explicarse porque la sonda utilizada alcanzó una actividad específica mayor (4.7×10 cpm/ μ g de DNA) que la obtenida para las otras sondas, lo que dio

una mayor sensibilidad al ensayo.

La presencia de un patrón de bandeo de la muestra 5 obtenido en este ensayo, similar al apreciado en la muestra 7 por hibridación con HPV 6 en condiciones estrictas, sugiere que quizá se trate del mismo tipo viral. Además, esta última muestra presenta un bandeo no esperado al hibridar con HPV 16 el mismo filtro, en condiciones relajadas. Esto se debe quizá, a que se está detectando la presencia de diversos tipos virales a la vez.

El ensayo de hibridación tipo Southern con HPV 18 en condiciones relajadas, de las muestras no estudiadas previamente en hibridación en punto, demuestra la presencia de uno o varios HPVs en todos los casos. Las muestras fueron digeridas con Bam HI y Bgl II, esperando que se tratara de los virus 6, 11, 16 y/o 18. Sin embargo, Bam HI no fue capaz de digerir en todos los casos al virus, lo cual se puede explicar porque se trate de virus diferentes a los esperados o bien que hayan perdido sitios de restricción para esta enzima, como en el caso de los virus descritos con anterioridad.

Finalmente, en la hibridación de los filtros con v-gyc no se detectó la amplificación de este oncogene. Estudios previos (Riou et al. 1984), demuestran que c-gyc se encuentra amplificado en estados avanzados de CaCu. Nuestros hallazgos demuestran que, en lesiones previas no existe una amplificación detectable por medio de nuestro ensayo; por lo que es probable que la

amplificación de este oncogene se trate de un evento tardío en la progresión al CaCu. Sería interesante, por tanto, llevar a cabo un estudio para detectar la actividad del oncogene por medio de la transcripción del mismo, ya que no se requiere que éste se encuentre amplificado para sobre-expresar su información; y ya que se trata de células en crecimiento, es de esperar que el gene myc se encuentre activo (Kelly 1986).

Los resultados obtenidos en los ensayos con biotina resultan alentadores, ya que debido a las características de los mismos (fácil manejo, bajo costo, poco riesgo en su manejo y adecuada sensibilidad) se abre la posibilidad de su utilización en el diagnóstico temprano del CaCu. Es bien sabido que mientras más oportunamente sean tratadas este tipo de lesiones, la posibilidad de curación es mayor. Actualmente, en nuestro país no se han incorporado este tipo de pruebas en clínicas y centros hospitalarios, por lo que consideramos que, junto con otros estudios que se realicen en el futuro, el presente trabajo ayudará en la implementación de este tipo de metodologías con fines diagnósticos.

8) APENDICES

8.1) Cálculo del T_m .

T_m es la temperatura en la que la mitad de una cantidad de DNA dúplex se desnaturaliza (Lehninger 1983). En el presente trabajo se estableció T_m-12 como condición de hibridación estricta, mientras que T_m-40 se consideró como condición relajada. El T_m se determinó de la siguiente manera:

$$T_m = 60.3 + 0.41 (G+C)\% - 650 / L$$

donde L es el número de nucleótidos (Marmur and Doty 1962; Wetmer and Davidson 1968).

El T_m decrece 1°C por cada reducción en la homología de pares de bases en 1% (Bonner et al. 1983).

Cada incremento de 1% en la concentración de formamida reduce el T_m en 0.7°C (McCanaughy et al. 1969; Casey and Davidson 1977).

Para fuerza iónica se hace la siguiente corrección:

$$(T_m)_{\mu 2} - (T_m)_{\mu 1} = 18.5 \log_{10} \mu 2 / \mu 1$$

donde: μ = fuerza iónica, $\mu = 1/2 \sum C_j Z_j$

C = gr/lit (en caso de electrolitos monovalentes (1:1) se expresa en molaridad)

Z = carga valencia del ion

Cuando la concentración de cationes monovalentes se incrementa 10 veces, el T_m disminuye en 16.6°C (Lewin 1980):

$$T_m = 0.41 (G+C)\% + 16.6 \log M + 81.5$$

El T_m se incrementa en 0.4°C por cada 1% de aumento en el porcentaje de G+C (Lewin 1980).

8.2) Cálculo del Cot 1/2.

La reasociación de cualquier DNA puede describirse como un producto de la concentración de DNA (C_0) y el tiempo de incubación (t). A este valor se le conoce simplemente como Cot. Se entiende como Cot 1/2 al valor requerido para que se lleve a cabo la mitad de la reasociación (Lewin 1985).

El tiempo de hibridación fue de 3 x Cot 1/2. El número de horas requeridas para alcanzar el Cot 1/2 fué determinado utilizando la siguiente ecuación (Maniatis et al. 1982):

$$\text{Cot } 1/2 = \frac{1}{X} \times \frac{Y}{5} \times \frac{Z}{10}$$

donde: X = el peso de la sonda añadida (en µg)

Y = su complejidad (para la mayoría de las sondas, la complejidad es proporcional a la longitud de la sonda en kb)

Z = el volumen de reacción (en ml).

9) BIBLIOGRAFIA

Aaronson, S.A. 1983. Unique aspects of the interactions of retroviruses with vertebrate cells: CP Rhoads Memorial Lecture. Cancer Res. 43: 1.

Abe, R., H. Umezumi, T. Uchida, S. Kariyone, N. Maseki, Y. Kaneko and M. Sakurai. 1986. Myeloblastoma with an 8;21 chromosome translocation in acute myeloblastic leukemia. Cancer 59: 1260.

Amersham International. 1984. Technical Bulletin 278250B.

Ames, B.N. 1979. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. Science 226: 860.

Androphy, E.J., J.T. Schiller and D.R. Lowy. 1985. Identification of the protein encoded by the E6 transforming gene of bovine papillomavirus. Science 230: 442.

Androphy, E.J., D.R. Lowy and J.T. Schiller. 1987. Bovine papillomavirus E2 Trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. Nature 325: 70.

Aurelian, L., I.I. Kessler, N.B. Rosenshein and G. Barbour. 1981. Viruses and gynecologic cancers: Herpesvirus protein (ICP-10/AG-4) a cervical tumor antigen that fulfills the criteria for a marker of carcinogenicity. Cancer 48: 455.

Batley, J. C. Moulding, R. Taub, W. Murphy, T. Stewart, H. Potter, G. Lenoix and P. Leder. 1983. The human c-myc oncogene: structural consequences of translocation into the IgH locus in Burkitt lymphoma. Cell 34: 779.

Beckmann, A.M., D. Myerson, J.R. Daling, N.B. Kiviat, C.M. Fenoglio and J.K. McDougall. 1985. Detection and localization of human papillomavirus DNA in human genital condylomas by in situ hybridization with biotinylated probes. J. Med. Virol. 16: 265.

Bentley, D.L. and M. Groudine. 1986. Novel promoter upstream of the human c-myc gene and regulation of c-myc expression in B-cell lymphomas. Mol. Cell. Biol. 6: 3481.

Beral, V. 1974. Cancer of the cervix: A sexually transmitted infection? Lancet i: 1037.

Berg, L.J., K. Singh and M. Botchan. 1986. Complementation of a bovine papilloma virus low-copy-number mutant: evidence for

a temporal requirement of the complementing gene. Mol. Cell. Biol. 6: 859.

Bernard, O., S. Cory, S. Gerondakis, E. Webb and J.M. Adams. 1983. Sequence of the murine and human myc oncogenes and two modes of myc transcription resulting from chromosome translocation in B lymphoid tumours. EMBO J. 2: 2375.

Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res. 7: 1513.

Bishop, J.M. 1983a. Cellular oncogenes and retroviruses. Ann. Rev. Biochem. 52: 301.

Bishop, J.M. 1983b. Homogeneously staining chromosomal regions containing amplified copies of an abundantly expressed cells from a human colon carcinoma. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 1707.

Bishop, J.M. 1987. The molecular genetics of cancer. Science 235: 305.

Blair, D.G., M. Oskarsson, T.G. Wood, W.L. Mc Clements, P.L. Fischinger and G.F. Vande. 1981. Activation of a transforming potential of a normal cell sequence: a molecular model for oncogenesis. Science 212: 941.

Bonner, T.L., D.J. Brenner, B.R. Neufeld and R.J. Britten. 1973. Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. J. Mol. Biol. 81: 123.

Boyd, J.T. and R.A. Doll. 1964. A study of the aetiology of carcinoma of the cervix uteri. Br. J. Cancer 18: 419.

Brinton, L.A. 1986. Current epidemiological studies Emerging hypotheses. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer, Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 17.

Broker, T.R. and M. Botchan. 1986. Papillomaviruses: retrospectives and prospectives. In: Cancer Cells 4: DNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 17.

Broker, T.R. and L. T. Chow. 1986. Human papillomaviruses of the genital mucosa: electron microscopic analysis of DNA heteroduplexes formed with HPV types 6, 11 and 18 In: Cancer Cells 4: DNA Tumor Viruses. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 384.

Buckley, J.D., R.W.C. Harris, R. Doli, M.P. Vessey and P.T. Williams. 1981. Case control study of the husbands of women with dysplasia or carcinoma of the cervix uteri. Lancet II: 1010.

Burghart, E. 1986. Natural history of cervical lesions. In:

Peto, R. and H. zur Hausen (eds.). Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 81.

Cartwright, R.A. and J.D. Sinson. 1980. Carcinoma of penis and cervix. Lancet I: 1246.

Casey, J. and N. Davidson. 1977. Rates of formation and thermal stabilities of RNA:DNA and DNA:DNA duplexes at high concentrations of formamide. Nucleic Acids Res. 4: 1539.

Chang, E.H., M.E. Furth, E.M. Scolnick and D.R. Lowy. 1982. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. Nature 297: 479.

Cooper, G.M., S. Okenquist and L. Silverman. 1980. Transforming activity of DNA of chemically transformed and normal cells. Nature 284: 418.

Coppleson, M. and B. Reid. 1968. The etiology of squamous carcinoma of the cervix. Obstet. Gynecol. 32: 432.

Cohen, S.N., A.S.Y. Chang and L. Hsu. 1983. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. Genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2110.

Collins, S.J. and M. Groudine. 1983. Rearrangement and amplification of c-abl sequences in the human chronic myelogenous leukemia cell line K-562. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 4813.

Croissant, D., F. Breitburd and G. Orth. 1985. Specificity of cytopathic effect of cutaneous human papillomaviruses. Clin. Dermatol. 3: 43.

Crum, C.P., H. Ikenberg, R.M. Richart and L. Gissmann. 1984. Human papillomavirus type 16 and early cervical neoplasia. N. engl. J. Med. 310: 880.

Crum, C.P., M. Mitao, R.U. Levine and S. Silverstein. 1985. Cervical papillomaviruses segregate within morphologically distinct precancerous lesions. J. Virol. 54: 675.

Dagert, M. and S.D. Ehrlich. 1979. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells. Gene 6: 23.

De la Loza, A. y X. Lima. 1976. El problema del cáncer en México. Sal. Pub. Mex. 18: 365.

De la Loza, A. y L. Arriaga. 1976. Avances en los niveles de salud en México en 1974. Sal. Pub. Mex. 18: 801.

De Villiers, E.-M., L. Gissmann and H. zur Hausen. 1981.

Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J. Virol.* 44: 393.

Diaz Perches, R. y R. Zaragoza. 1974. *Consideraciones Acerca del Problema del Cáncer en México*. Memorias de las Jornadas Médicas del Centro Médico Privado "Hospital Francés". México.

DiLuca, D., S. Pilloti, B. Stefanon, A. Rotola, P. Monini, M. Tognon, G. De Palo, F. Rilke and E. Cassai. 1986. Human papillomavirus type 16 DNA in genital tumours: A pathological and molecular analysis. *J. Gen. Virol.* 67: 583.

DiMaio, D., D. Guralski and J.T. Schiller. 1986. Translation of open reading frame E5 of bovine papillomavirus is required for its transforming activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 1797.

Donner, P., J. Greiser-Wilke and K. Moelling. 1982. Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene product of avian myelocytomatosis virus. *Nature* 296: 262.

Doobar, J., D. Campbell, R.J.A. Grand and P.H. Gallimore. 1986. Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J.* 5: 355.

Dürst, M., L. Gissmann, H. Ikenberg and H. zur Hausen. 1983. A new type of papilloma-virus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsies from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 3812.

Dürst, M., C.M. Croce, L. Gissmann, E. Schwartz, K. Huebner. 1984. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 1070.

Dürst, M., A. Kleinheinz, M. Hotz and L. Gissmann. 1985. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J. Gen. Virol.* 66: 1515.

Dürst, M., E. Schwartz and L. Gissmann. 1986. Integration and persistence of human papillomavirus DNA in genital tumors. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.). *Viral Etiology of Cervical Cancer*. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 273.

Dürst, M., C.M. Croce, L. Gissmann, E. Shwarz and K. Huebner. 1987. Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 1070.

Eglin, R.P., F. Shabo, A.B. Mac Lean, J.C.M. Macnab and J.B. Clements. 1981. Detection of RNA complementary to herpes simplex virus DNA in human cervical squamous cell neoplasms. *Cancer Res.* 41: 3597.

Eisenman, R.N., C.Y. Tachibana, H.D. Abrams and S.R. Hann. 1985. v-*myc* and c-*myc*-encoded proteins are associated with the

nuclear matrix. Mol. Cell. Biol. 5: 114.

Engel, L.W., C.A. Heilman and P.M. Howley. 1983. Transcriptional organization of the bovine papillomavirus type 1. J. Virol. 47: 516.

Feldman, L.T. and J.R. Nevins. 1983. Localization of the adenovirus E1Aa protein, a positive-acting transcriptional factor, in infected cells. Mol. Cell. Biol. 3: 829.

Fentanes, E. 1979. Deteccion Oportuna del Carcinoma Cervico Uterino. Boletin del Instituto Nacional de Cancerologia, Mexico.

Foulds, L. 1969. Neoplastic Development Vol. 1. Academic Press, New York.

Franceschi, S., C. La Vecchia and A. Decarli 1986. Relation of cervical neoplasia with sexual factors, including especific venereal diseases. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 65.

Franke, W.W., R. Moll, T. Achtstaetter and C. Kuhn 1986. Cell typing of epithelia and carcinomas of the female genital tract using cytoskeletal proteins as markers. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 121.

Fu, Y.S., L.T. Temmin, Y.M. Olaiola and J.W. Reagan. 1981. Nuclear DNA characteristics of microinvasive squamous carcinoma of the uterine cervix In: Fenoglio, C.M. and M.W. Wolff (eds.) Progress in surgical pathology. Vol. I Masson. New York. pp. 233.

Fukushima, M., T. Okagaki, L.B. Twiggs, B.A. Clark, K.R. Zachow, R.S. Ostrow and A.J. Faras. 1985. Histological types of carcinoma of the uterine cervix and the detectability of human papillomavirus DNA. Cancer Res. 45: 3252.

Galloway, D.A. and J.K. Mc Dougall. 1983. The oncogenic potential of herpes simplex viruses. Evidence for a "hit and run" mechanism. Nature 302: 21.

Giri, I. and O. Danos. 1986. Papillomaviruses genomes: from sequence data no biological properties. Trends. Genet. 2: 227-232.

Girvitz, S.C., S. Bracchetti, A.J. Rainbow and F.L. Graham. 1980. A rapid and efficient procedure for the purification of DNA from agarose gels. Anal. Biochem. 106: 492.

Gissmann, L., H. Pfister and H. zur Hausen. 1977. Human papillomavirus (HPV): characterization of four different isolates. Virology 76: 569.

Gissmann, L. and H. zur Hausen. 1978. Physical

characterization of the deoxyribonucleic acids of different human papillomaviruses (HPV). Med. Microbiol. Immunol. 166: 3.

Gissmann, L., E.M. de Villiers and H. zur Hausen. 1982. Analysis of human genital warts (condylomata acuminata) and other genital tumors for human papilloma virus type 6 DNA. Int. J. Cancer 29: 143.

Gissmann, L., V. Diehl, H.J. Schultz-Coulon and H. zur Hausen. 1982. Molecular cloning and characterization of human papilloma virus DNA derived from laryngeal papilloma. J. Virol. 44: 393.

Gissmann, L., L. Wolnik, H. Ikenberg, U. Koldovsky, H.G. Schndörch and H. zur Hausen. 1983. Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 560.

Gissmann, L. 1984. Papillomaviruses and their association with cancer in animals and in man. Cancer Surv. 3: 161.

Graham, S., R. Priore, M. Graham, R. Browne, W. Burnett and D. West. 1979. Genital cancer in wives of penile cancer patients. Cancer 44: 1870.

Greenberg, M.E., A.L. Hermanowski and E.B. Ziff. 1986. Effect of protein synthesis inhibitors on growth factor activation of c-fos, c-myc, and actin gene transcription. Mol. Cell. Biol. 6: 1050.

Groff, D.E. and W.D. Lancaster. 1986. Genetic analysis of the 3' early region transformation and replication functions of bovine papillomavirus type 1. Virology 150: 221.

Gross, G., H. Ikenberg, E. M. De Villiers, A. Schneider, D. Wagner and L. Gissmann. 1986. Bowenoid papulosis: A venereally transmissible disease as reservoir for HPV 16. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer, Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 149.

Grussendorf-Conen, E.I., H. Ikenberg and L. Gissmann. 1985. Demonstration of HPV-16 genomes in the nuclei of cervix carcinoma cells. Dermatologica 170: 199.

Grussendorf-Conen, E.I. 1986. *In situ* hybridization with papillomavirus DNA in genital lesions. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer, Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 239.

Hakama, M. 1986. Efficacy of screening for cervical cancer. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.). Viral Etiology of Cervical Cancer Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 45.

Hanaia, N., M. Castagna, D. Shaool, D. Zeliszewski and J.

- Harel. 1985. Effects of tumor promoters on the expression of a tumor-related multigenic set in human cells. *Cancer Res.* **45**: 6058.
- Hanawalt, P.C. and A. Sarasin. 1986. Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. *Trends. Genet.* **2**: 124.
- Howley, P.M. 1983. The molecular biology papillomavirus transformation. *Am. J. Pathol.* **113**: 414.
- Howley, P.M., Y.C. Yang, B. Spalholz and M.S. Rabson. 1986. Molecular aspects of papillomavirus host-cell interaction In: Peto, R. and H. zur Hausen. pp. 261.
- Hurley, J.B., M.A. Simon and D.B. Teplow. 1984. Homologies between signal transducing G proteins and *ras* gene products. *Science* **226**: 860.
- Jenson, A.B., J.D. Rosenthal, C. Olson, F. Pass, W.D. Lancaster and K. Shah. 1980. Immunologic relatedness of papillomaviruses from different species. *J. Natl. Cancer Inst.* **64**:495.
- Kahn, T., E. Schwarz and H. zur Hausen. 1986. Molecular cloning and characterization of the DNA of a new human papillomavirus (HPV 30) from a laryngeal carcinoma. *Int. J. Cancer.* **37**: 61.
- Kelly, K. 1986. The regulation and expression of *c-myc* in normal and malignant cells. *Ann. Rev. Immunol.* **4**: 317.
- Kessler, I.I. 1977. Venereal factors in human cervical cancer. *Cancer* **39**: 1912.
- Kessler, I.I. 1986. Cervical cancer: social and sexual correlates. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) *Viral Etiology of Cervical Cancer*. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 55.
- Kieg, P., E. Amtmann and G. Sauer. 1983. The simultaneous extraction of high-molecular-weight DNA and RNA from solid tumors. *Anal. Biochem.* **134**: 288.
- Kingston, R.E., A.S. Baldwin and P.A. Sharp. 1984. Regulation of heat shock protein 70 gene expression by *c-myc*. *Nature* **312**: 280.
- Klein, G. 1973. Summary of papers delivered at the conference on herpesvirus and cervical cancer (Key Biscayne, Florida). *Cancer Res.* **33**: 1557.
- Klein, G. and E. Klein. 1985. Evolution of tumours and the impact of molecular oncology. *Nature* **315**: 190.

Kohn, H.I. and R.J.M. Fry. 1984. Radiation carcinogenesis. N. Engl. J. Med. 310: 504.

Komly, C.A., F. Breitburd, D. Croissant and R.D. Streeck. 1986. J. Virol. 60: 813.

Koss, L.G. 1986. Chairman's concluding remarks: Sequence of events in carcinogenesis of the uterine cervix. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 179.

Kreider, J. W., M.K. Howett, S.A. Wolfe, G.L. Bartlett, R.J. Zaino, T.V. Sedlacek and R. Mortel. 1985. Morphological transformation *in vivo* of human uterine cervix with papillomavirus from condylomata acuminata. Nature 317: 639.

Kreider, J.W., M. Howett, A. Leure-Dupree, R. Zaino and J.J. Weber. 1987. Virology 61: 590.

La Vecchia, C., S. Franceschi, A. Decarli, M. Faseli. A. Gentile and P. Gritti. 1985. Electrocoagulation and the risk of cervical neoplasia. Obstet. Gynecol. 66: 703.

Lancaster, W.D., R.J. Kurman, L.E. Sanz, S. Perry and A.B. Jenson. 1983. Human papillomavirus: detection of viral DNA sequences and evidence for molecular heterogeneity in metaplasias and dysplasias of the uterine cervix. Intervirology 20: 202.

Lancaster, W.D. and C. Olson. 1982. Animal papillomaviruses. Microbiol. Rev. 46: 191.

Leary, J.J., D.J. Brigati and D.C. Ward. 1983. Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybridized to DNA or RNA immobilized on nitrocellulose: Bio-blots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 4045.

Lehn, H., T.M. Ernst and G. Sauer. 1984. Transcription of episomal papillomavirus DNA in human condylomata acuminata and Buschke-Lowenstein tumours. J. Gen. Virol. 65: 2003.

Lehn, H., P. Krieg and G. Sauer. 1985. Papillomavirus genomes in human cervical tumors: analysis of their transcriptional activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5540.

Lehninger, A.L. 1975. Biochemistry. Worth Publishers, New York. pp. 1104.

Lewin, B. 1980. Gene expression. Vol.II. Eucaryotic chromosomes. Jhon Wiley & sons, New York. (1160p).

Lewin, B. 1985. Genes II. John Wiley & sons, New York.

Li, J.Y., F.P. Li, W.J. Blot, R.W. Miller and J.F. Faumeni. 1982. Correlation between cancers of the uterine cervix and penis in China. J. Natl. Cancer. Inst. 69: 1063.

Logan, W.P.D. 1982. Cancer Mortality by Occupation and Social Class 1851-1971. IARC Scientific Publications no. 36. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France.

Lusky, M. and M.R. Botchan. 1984. Characterization of the bovine papillomavirus plasmid maintenance sequences. Cell 36: 391.

Lusky, M. and M.R. Botchan. 1985. Genetic analysis of bovine papillomavirus type 1 trans-acting replication factors. J. Virol. 53: 955.

Lusky, M. and M.R. Botchan. 1986. Transient replication of bovine papilloma virus type 1 plasmids: cis and trans requirements. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3609.

Mac Gregor, J.E. and G. Innes. 1980. Carcinoma of penis and cervix. Lancet 1: 1246.

Macnab, J.C.M., S.A. Walkinshaw, J.W. Cordiner and J.B. Clements. 1986. Human papillomavirus in clinically and histologically normal tissue of patients with genital cancer. N. Engl. J. Med. 315: 1052.

Mandel, M. and H. Higa. 1970. Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53: 154.

Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Martinez, I. 1969. Relationship of squamous cell carcinoma of the cervix to squamous carcinoma of the penis. Cancer 24: 777.

Marmur J. and P. Doty. 1962. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. J. Mol. Biol. 5: 109.

Matsukura, T., T. Kanda, A. Furuno, H. Yoshikawa, T. Kawana, and K. Yoshiike. 1986. Cloning of monomeric human papillomavirus type 16 DNA integrated within cell DNA from a cervical carcinoma. J. Viral 59: 979.

Matthews, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Intervirology 17: 1.

McConaughy, B.L., C.D. Laird and B.J. McCarthy. 1969. Nucleic acid reassociation in formamide. Biochemistry 8: 3289.

McDougall, J.K., A.M. Beckmann and D.A. Galloway. 1986. The enigma of viral nucleic acids in genital neoplasia. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 65.

- Meanwell, C.A., M.F. Cox, G. Blackledge and N.J. Maitland. 1987. HPV 16 DNA in normal and malignant cervical epithelium: implications for the aetiology and behaviour of cervical neoplasia. Lancet **1**: 703.
- Meisels, A. and R. Fortin. 1976. Condylomatous lesions of the cervix and vagina I. Cytologic patterns. Acta Cytol. **20**: 505.
- Meisels, A., R. Fortin and M. Roy. 1977. Condylomatous lesions of the cervix and vagina II. Cytologic, colposcopic and histopathologic study. Acta Cytol. **21**: 379.
- Meisels, A., M. Roy, M. Fortier, C. Morin, M. Casas-Cordero, K.V. Shah and H. Turgeon. 1981. Human papillomavirus infection of the cervix. The atypical condiloma. Acta Cytol. **25**: 7.
- Miles, B.D. and H.L. Robinson. 1985. High frequency transduction of c-erbB in avian leukosis virus-induced erythroblastosis. J. Virol. **54**: 295.
- Millan, W.M., J.A. Davis, T.E. Torbet and M.S. Campo. 1986. DNA sequences of human papillomavirus types 11, 16, and 18 in lesions of the uterine cervix in the west of Scotland. Br. Med. J. **293**: 93.
- Naib, Z.M., A.J. Nahmias, W.E. Josey and J.H. Kramer. 1969. Genital herpetic infection. Association with cervical dysplasia and carcinoma. Cancer **23**: 940.
- Nelson, J.H., H.E. Awrette and R. Richart. 1984. Dysplasia, carcinoma in situ and early invasive cervical carcinoma. CA-Cancer J. Clin. **34**:306.
- Nicolson, G.L. 1982. Cancer metastasis. Organ colonization and the cell surface properties of malignant cells. Biochim. Biophys. Acta. **695**: 113.
- Norgard, M.V., K. Keem and J.J. Monohan. 1978. Factors affecting the transformation of Escherichia coli strain X 1776 by pBR322 plasmid DNA. Gene **3**: 279.
- Olper, R., M. Garcia-Sainz, R. Garza y L. Benitez. 1979. Principales neoplasias malignas en el Hospital de Oncologia del Centro Médico Nacional, IMSS. Patologia **17**: 169.
- Oriel, J.D. and J.D. Almeida. 1970. Demonstration of virus particles in human genital warts. Brit. J. Vener. Dis. **46**: 37.
- Orth, G., M. Faure and O. Croissant. 1977. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. J. Virol. **24**: 108.
- Ostrow, R.S., M. Bender, M. Niimura, T. Seki, M. Kawashima, F. Pass and A.J. Faras. 1982. Human papillomavirus DNA in

cutaneous primary and metastasized squamous cell carcinomas from patients with epidermoplasia verruciformis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 1634.

Parkin, D.M., J. Stjernsward and C.S. Muir. 1984. Estimates of the worldwide frequency of twelve major cancers. Bull. WHO 62: 163.

Pater, M.M. and A. Pater. 1985. Human papillomavirus types 16 and 18 sequences in carcinoma cell lines of the cervix. Virology 145: 313.

Persson, H. and P. Leder. 1984. Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human c-myc oncogene. Science 225: 718.

Peto, R. 1986. Introduction: geographic patterns and trends. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.). Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 3.

Pfister, H. 1984. Biology and biochemistry of papillomaviruses. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 99: 111.

Pilacinski, W.P., D.L. Glassman, R.A. Krzyzek, P.L. Sadowsky, and A.K. Robbins. 1984. Cloning and expression in Escherichia coli of the bovine papillomavirus L1 and L2 open reading frames. Biotechnology 2: 356.

Pirisi, L., S. Yasumoto, M. Feller, J. Doniger and J.A. DiPaolo. 1987. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. J. Virol. 61: 1061.

Pitot, H.C. 1982. The natural history of neoplastic development: the relation of experimental models to human cancer. Cancer 49: 1206.

Rando, R.F., D.E. Groff, J.G. Chirikjian and W.D. Lancaster. 1986. Isolation and characterization of a novel human papillomavirus type 6 DNA from an invasive vulvar carcinoma. J. Virol. 57: 353.

Rawls, W.E. and E. Adam. 1977. Herpes simplex viruses and human malignancies. In: Hiatt, H.H., J.D. Watson and J.A. Winsten (eds) Origins of human cancer. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. pp: 1133.

Rawls, W.E., L.D. Marrett and W.C. Reeves. 1986. An analysis of the association between herpes simplex virus type 2 antibodies and cervical cancer. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 187.

Raymond, C.A. 1987. Cervical dysplasia upturn worries

gynecologists, health officials. JAMA 257: 2397.

Reid, R., C.P. Crum, B.R. Herschman, Y.S. Fu, L. Braun, K.B. Shah, S.J. Agronow and C.R. Standhope. 1984. Genital warts and cervical cancer III. Subclinical papillomavirus infection and cervical neoplasia are linked by spectrum of continuous morphologic and biologic change. Cancer. 53: 943.

Reid, R., Y.S. Fu, B.R. Herschman, C.P. Crum, L. Braun, V.D. Shah, S.V. Agronow and C.R. Stanhope. 1984. Genital warts and cervical cancer. VI. The relationship between aneuploid and polyploid cervical lesions. Am. J. Obstet. Gynecol. 150: 189.

Reid and Fu. 1986. Is there a morphologic spectrum linking condyloma to cervical cancer?. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 91.

Rensberger, B. 1984. Cancer, the new synthesis. Cause. Science 84. 5: 28.

Richart, R.M. 1973. Cervical intraepithelial neoplasia. Pathol. Annu. 8: 301.

Rigby, P.W.J., M. Dieckman, C. Rhodes and P. Berg. 1977. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113: 237.

Riou, G.M. Barrois, I. Tordjman, V. Dutronquay et G. Orth. 1984. Présence de génomes de papillomavirus et amplification des oncogènes c-myc et c-Ha-ras dans des cancers envahissants du col de l'utérus. C. R. Acad. Sc. Paris 299(II): 575.

Roberts, J. and H. Weintraub. 1986. Negative regulation of the BPV replicon. Cell 46: 741.

Rodriguez, J. 1983. Carcinoma cervicouterino en el noroeste de México. Aspectos clinicos. Rev. Med. IMSS 21: 183.

Rotkin, I.D. 1973. A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. Cancer Res. 33: 1353.

Rotkin, I.D. 1981. Etiology and epidemiology of cervical cancer. Curr. Top. Pathol. 70: 91.

Rous, P. and J.W. Beard. 1935. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit carcinomas. J. Exp. Med. 79: 511.

Rowley, J.D. 1984. Biological implications of consistent chromosome rearrangements in leukemia and lymphoma. Cancer Res. 44: 3159.

Rowson, K.E.K. and B.W.J. Mahy. 1967. Human papova (wart)

virus. Bacteriol. Rev. 31: 110.

Sarver, N., M.S. Rabson, Y.C. Yang, J.C. Byrne and P.M. Howley. 1984. Localization and analysis of bovine papillomavirus type 1 transforming functions. J. Virol. 52: 377.

Schlehofer, J.R. 1986. Interaction of herpes simplex virus infection with host cell DNA. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer. Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 211.

Schneider, A., H. Kraus, R. Schuhmann and L. Gissmann. 1985. Papillomavirus infection of the lower genital tract: detection of viral DNA in gynecological swabs. Int. J. Cancer 35: 443.

Schwartz, E., U.K. Fresese, L. Gissmann, W. Mayer, B. Roggenbuck, A. Stremlau and H. zur Hausen. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. Nature 314: 111.

Selvaggi, S.M. 1986. Cytologic detection of condilomas and cervical intraepithelial neoplasia of the oterine cervix with histologic correlation. Cancer 59: 2076.

Shope, R.E. and E.W. Hurst. 1933. Infectious papillomatosis of rabbits, with a note on the histopathology. J. Exp. Med. 58: 607.

Smith, P.G., L.J. Kinlen, G.C. White, A.M. Adelstein and A.J. Fox. 1980. Mortality of wives of men dying with cancer of the penis. Br. J. Cancer, 41: 422.

Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98: 503.

Southern, E. 1980. Gel electrophoresis of restriction fragments. Methods. Enzimol. 69: 152.

Spalholz, B.A., Y.C. Yang and P.M. Howley. 1985. Transactivation of a bovine papilloma virus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. Cell 42: 183.

Spriggs, A.I., C.E. Bowey and R.H. Cowdell. 1971. Chromosomes of precancerous lesions of the cervix uteri: new data and new review. Cancer 27: 1239

Stantbridge, E.J., C.J. Der, C.J. Doersen. 1982. Human cell hybrids: Analysis of transformation and tumorigenicity. Science 215: 252.

Stanton, L., R. Watt and K.B. Marcu. 1983. Translocation breakage and truncated transcripts of c-myc oncogene in murine plasmacytomas. Nature 303: 401.

Steinberg, B.M. 1986. Laryngeal papillomatosis is associated with a defect in cellular differentiation. Ciba Found. Symp. 120: 208.

Strudzinski, G.P., Z.S. Brehi, C. Feldman and R.A. Watt. 1983. Participation of c-yc protein in DNA synthesis of human cells. Science 234: 467

Syrjänen, K., M. Väyrynen, O. Castren, M. Yliskoski, R. Mäntyjärvi, S. Pyrhönen and S. Saarikoski. 1984. Sexual behaviour of the females with human papillomavirus (HPV) lesions in the uterine cervix. Br. J. Vener. Dis. 60: 243.

Syrjänen, K., R. Mäntyjärvi, S. Parkkinen, M. Väyrynen, S. Saarikoski, S. Syrjänen and O. Castren. 1986. Prospective follow-up in assessment of the biological behavior of cervical HPV-associated dysplastic lesions. In: Peto, R. and H. zur Hausen (eds.) Viral Etiology of Cervical Cancer, Banbury Report 21. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp: 167.

Syrjänen, K.J. 1986. Human papillomavirus (HPV) infections of the female genital tract and their associations with intraepithelial neoplasia and squamous cell carcinoma. Pathol. Annu. 21: 53.

Syrjänen, K.J. 1987. Biology of human papillomavirus (HPV) infections and their role in squamous cell carcinogenesis. Med. Biol. 65: 21.

Tabin, C.J., S.M. Bradley, C.I. Bargmann, R.A. Weinberg, A.G. Papagentre and A.M. Scolvick. 1982. Mechanism of activation of a human oncogene. Nature 300: 143.

Tabin, C.J. and R.A. Weinberg. 1985. Analysis of viral and somatic activations of the c-Ha-ras gene. J. Virol 53: 260

Taichman, L.B., S.S. Reilly and R.F. La Porta. 1983. The role of keratinocyte differentiation in the expression of epitheliotropic viruses. J. Invest. Dermatol. 81: 137.

Takebe, N., Y. Tsunokawa, S. Nozawa, M. Terada and T. Sugimura. 1987. Conservation of E6 and E7 regions of human papillomavirus types 16 and 18 present in cervical cancers. Biochemical and Biophysical Res. Comm. 143: 120

Vonka, V., J. Hanka, I. Hirsch, M. Zanadova, M. Kucmar, A. Suchankova, D. Rezakova, J. Bronzek, M. Press, E. Domorazkova, B. Svoboda, A. Havrankova and J. Jelinek. 1984. Prospective study on the relationship between cervical neoplasia and herpes simplex type-2 virus-II. Herpes simplex type-2 antibody presence in sera taken at enrollment. Int. J. Cancer. 33: 61

Vennström, B., C. Moscovici, H.M. Goodman and J.M. Bishop. 1981. Molecular cloning of the avian myelocytomatosis virus genome and recovery of infectious virus by transfection of

chicken cells. *J. Virol.* **39**: 625.

Waldek, S., F. Rösl and H. Zentgraf. 1984. Origin of replication in episomal bovine papillomavirus type 1 DNA isolated from transformed cells. *EMBO J.* **3**: 2173

Wetmer, R. and N. Davidson. 1968. Kinetics of renaturation of DNA. *J. Mol. Biol.* **31**: 349.

Wettstein, F.O. and J.G. Stevens. 1982. Variable-sized free episomes detected in some. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**: 790.

Willecke, K. and R. Shafer. 1984. Human oncogenes. In: *Human Genetics*. Springer Verlag.

Willis, R.A. 1948. *Pathology of tumors*. Butterworth & Co. London. pp: 992

Woodruff, J.D., L. Braun, R. Cavalieri, P. Gupta, F. Pass and K.V. Shah. 1980. Immunologic identification of papillomavirus antigen in condyloma tissues from the female genital tract. *Obstet. Gynecol.* **56**: 727.

Yang Y.C., B.A. Spalholz, M.S. Rabson and P.M. Howley. 1985. Dissociation of transforming and *trans*-activation functions for bovine papillomavirus type 1. *Nature* **318**: 575.

Yasumoto, S., A.L. Burkhardt, J. Doniger and J.A. DiPaolo. 1986. Human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation of NIH 3T3 cells. *J. Virol.* **57**: 572.

Yasumoto, S., J. Doniger and J.A. DiPaolo. 1987. Differential early viral gene expression in two stages of human papillomavirus type 16 DNA-induced malignant transformation. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2165.

Yee, C., I. Krishnan-Hewlett, C. Baker, R. Schlegel and P. Howley. 1985. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.* **119**(3): 361.

Yunis, J.J. and L. Soreng. 1984. Constitutive fragile sites and cancer. *Science* **226**: 1199.

Zalce, H., R. Blancarte y J.N. Cisneros. 1975. Los programas de detección del cáncer cervicouterino y mamario en los estados de la frontera norte de México. *Sal. Pub. Mex.* **17**: 803.

Zur Hausen, H., W. Meinhof, W. Schreiber, G.W. Bornkamm. 1974. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int. J. Cancer* **13**: 650.

Zur Hausen, H. 1976. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* **36**: 794.

Zur Hausen, H. 1977. Human papillomaviruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 78: 1.

Zur Hausen, H. 1987. Papillomavirus in human cancer. *Cancer* 59: 1692.