



*Universidad Nacional Autónoma
de México*

Escuela Nacional de Estudios Profesionales

IZTACALA

**DETECCION Y CARACTERIZACION DE SECUEN-
CIAS DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO TIPO 18
EN CANCER CERVICO - UTERINO.**

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de

B I O L O G O

presenta

Laura Berthila Aviles Castro

San Juan Iztacala, México, 1989



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

A mis padres:

Alberto y Bernhila

Por haberme guiado por
el camino de la educación,
estudio y superación.

Por haberme dado su
confianza y cariño.

Por el gran apoyo que
siempre me han brindado.

A mis hermanos y amigos:

Por contar en todo momento
con su apoyo, siempre
incondicional y desinteresado

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Patricio Gariglio V. su asesoría y el permitirme realizar el presente trabajo en su laboratorio en el CINVESTAV-IPN. AL DR. Alejandro García C. por su valiosa cooperación. A el B. Efraín Garrido y al P. de B. Cesar Bravo Bolaños por su ayuda y compañerismo. Y con especial gratitud al B. Luis Marat Alvarez, por todo el tiempo dedicado a la realización de este trabajo y por su apoyo incondicional.

INDICE

RESUMEN.....	1
ABREVIATURAS.....	2
INTRODUCCION.....	3
Estado físico del ADN viral.....	5
Carcinogénesis.....	7
Incidencia.....	8
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL Y METODOS.....	12
Extracción de ADN a partir de tejidos.....	12
EXtracción del ADN plasmídico.....	16
Purificación del ADN plasmídico.....	17
Electroforesis en geles de agarosa.....	18
Purificación de fragmento de ADN.....	19
Método de transferencia de ADN.....	20
Marcaje de ADN.....	21
Hibridación de ADN celular.....	23
RESULTADOS.....	24
DISCUSION.....	38
CONCLUSIONES.....	42
GLOSARIO.....	43
APENDICE.....	45
BIBLIOGRAFIA.....	47

RESUMEN

La presencia de secuencias de Papillomavirus Humano (PVH) asociadas a tumores cervicales ha sugerido un posible papel de éstos virus en oncogénesis genital. PVH tipo 18, se ha detectado de un 10 a 20 % de las muestras analizadas en varias partes del mundo. En nuestro país por medio de la elaboración de éste trabajo se detectó en un 7 % de las muestras analizadas empleando la técnica de transferencia de ADN Southern. El ADN de PVH-18, se encontró en forma integrada en el genoma celular, por lo que se planteó un modelo de integración, en donde se supone que se encuentran los marcos de lectura abierta E6, inicio de E7, fin de L1 y el LCR ó región control completa.

ABREVIATURAS

ADN = Acido 2' Desoxirribonucleico
ARNm = Acido Ribonucleico mensajero
BSA = Albumina Serica Bovina
C41 = Celulas Cervicales Humanas con PVH18
CaCU = Cancer CervicoUterino
COS = Celulas de riñon de mono transformadas con SV40.
dNTP = 2' Deoxinucleotido5'triFosfato
EDTA = Etildiaminotetracetato diSodico
HeLa = Celulas de Carcinoma Cervical Humano con PVH18.
LCR = Region control (Long Control Region) de PV.
MLA = Marco de Lectura abierta.
PV = Papilomavirus
PVB1= Papilomavirus Bovino tipo 1
PVH = Papilomavirus Humano
TE = TrisEDTA
SDS = Dodecil Sulfato de Sodio
SSC = Solucion Salina Citrato
SSPE = Solucion Salina Fosfato EDTA.
SW13.1= Celulas de Adenocarcinoma adrenocortical humano.
SW756 = Celulas Cervicales Humanas con PVH18
TBE = TrisBoratosEDTA

INTRODUCCION

El cáncer es una enfermedad que afecta a organismos multicelulares, se caracteriza por la proliferación y dispersión de formas celulares anormales.

Teóricamente en organismos superiores, el nivel de cáncer puede resultar por una falla en la organización, genómica ó un defecto en la forma en la que los organismos mantienen su estructura a pesar de varias agresiones ambientales. (E.J. Ambrose, 1975)

Las células neoplásicas difieren en muchos sentidos de las normales, esta transformación puede definirse como un cambio heredable en los caracteres y las propiedades de una célula, que se manifiesta por pérdida del control regulatorio del potencial de crecimiento, pérdida de inhibición por contacto, movimientos celulares en cultivo, cambios en morfología, estructura antigénica, bioquímica y por lo regular cariotípica, además de otros atributos que entrañan la capacidad para invadir y dar metástasis. (Robbins y Angell, 1973).

zurHausen (1977) ha sugerido desde hace más de 10 años el posible papel de los papilomavirus en la inducción de cáncer cervical. Los papilomavirus (PVH) son un grupo de

virus pequeños de doble cadena circular cerrada y pertenecen a la familia PAPOVAVIRIDAE, al igual que polio y SV 40. Estos virus se les encuentra asociados con lesiones epiteliales benignas como son verrugas, condilomas y papilomas, así como también con tumores de tejido del mismo origen que se presentan en algunos vertebrados superiores (Baker, 1987).

El Papilomavirus bovino tipo 1 (PVB1) ha servido como modelo para el entendimiento de la genética molecular del grupo papilomavirus (Howley et al. 1986). Su genoma, tiene un tamaño molecular de aproximadamente 8 Kb y presenta varios marcos de lectura abierta (MLA), 8 de los cuales corresponden a la expresión temprana (E) y dos a la expresión tardía (L). Así mismo, presentan una región no codificadora (LCR) en la que residen varios promotores, elementos de control transcripcional y el origen de replicación. Las regiones E1 a E8, a excepción de E4, probablemente codifiquen para proteínas asociadas con las funciones de replicación viral, transformación y mantenimiento de la forma circular o plasmídica. (Doobar, 1986; Howley, 1986). El marco de lectura abierta E2 codifica dos funciones opuestas; la transactivación y la represión del LCR por medio de 2 proteínas separadas (Chow-Chi H, 1987). Mientras que los MLA L1 y L2 codifican para las proteínas estructurales de la

cápside (Pfister, 1987).

Existen más de 40 tipos de PVH, entre los que se pueden mencionar los tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 42 y 45 que están asociados con una variedad de lesiones anogenitales benignas y malignas. El ADN de PVH tipos 16, 18, 31, 33, 39, 42 y 45 han sido detectados predominantemente en displasias cervicales, así como en carcinomas cervicales invasivos y metastásicos. (Baker, 1986; Beaudenon, 1987; Cole y Danos, 1987; Zohreh, 1987).

Las investigaciones que se han realizado en los últimos años acumulan evidencias sobre el papel que juegan los papilomavirus tipo 16 y 18 en el cáncer cervical humano, ya que se han encontrado hasta en un 90 % de las muestras analizadas. (Durst, 1983). El genoma de PVH se ha detectado en numerosas investigaciones por medio del análisis de transferencia Southern. (Gissmann, 1984. Schwartz, 1985) Obteniéndose un alto porcentaje de PVH-16 reduciéndose notoriamente en el porcentaje encontrado para PVH-18 en muestras de Cáncer Cérvico-Uterino CaCU. (Durst, 1983. Gissmann y Schwarz, 1986).

ESTADO FÍSICO DEL ADN VIRAL

El estado físico del ADN detectado en las muestras de tumor se relaciona generalmente al estadio de invasividad de

las muestras analizadas, de tal forma que en neoplasias benignas se encuentra el genoma viral en su forma circular, mientras que en estadios avanzados de CaCU, se detecta generalmente integrado en el genoma celular hospedero. (Durst, 1985). El número de copias del ADN viral es variable, así hay tumores que contienen una sola copia del genoma viral por célula, otros múltiples copias en uno o varios sitios de integración. (Pfister, 1987)

Durst, Schwarz y Gissman en 1985, analizaron biopsias de carcinoma cervical, encontrando predominantemente el genoma de PVH- 16 y 18 integrado en varios sitios del ADN celular, detectando inclusive moléculas oligoméricas episomales del ADN viral.

Se han realizado numerosos trabajos para estudiar la forma de integración de los PVH en líneas celulares derivadas de cáncer cervical. He La, C4-1 y SW756 son células que tienen integraciones de PVH-18. El genoma completo del virus, se ha detectado en las células SW756, con la región temprana interrumpida en dos porciones en cada copia integrada. En las células He La y C4-1 se encuentran ausentes segmentos de PVH de 2 a 3 Kb correspondientes a la región de E2 a L2; sin embargo, los análisis de hibridación muestran que las tres líneas celulares contienen la región control ó LCR y E6- E7 (Durst, 1985. Pater y Pater, 1985. Schwarz, et al, 1985. Schwarz, 1986; Lazo, 1987).

La integración viral puede jugar un papel muy importante en el proceso de tumorigénesis, ya que ésta somete al genoma viral a una nueva situación regulatoria. Así pues el ADN viral integrado puede quedar bajo la regulación de elementos celulares alterando su regulación normal. En cualquier caso el genoma viral, particularmente si no está completo, es puesto fuera de su ciclo de vida normal y como consecuencia de esto varias de sus funciones virales pueden convertirse en prescindibles. (Lazo, 1987).

CARCINOGENESIS.

El conejo ha resultado de mucha utilidad para el estudio de las características oncogénicas de los Papilomavirus, se menciona que éstos virus por sí solos son débiles oncógenos y la carcinogénesis parece depender de una exposición adicional de carcinógenos físicos y químicos, como la luz UV, rayos X, y ciertos componentes especiales de la dieta. (Pfister, 1987) En humanos, la epidermodisplasia verruciforme representa un excelente modelo en el estudio de los PVH en la conversión maligna de tumores. (Jablonska, 1972). La predisposición genética en pacientes que desarrollan lesiones epiteliales durante su infancia, las cuales son inducidas por PVH, no son observadas normalmente en la población (Pfister, 1987),

éstas lesiones persisten durante toda la vida y gradualmente se extienden por todo el cuerpo. Existen alrededor de 15 tipos de PVH, característicos de esta enfermedad y el promedio de personas que desarrollan cáncer después de los 25 años de persistencia del virus; es de un tercio a un cuarto de la población enferma total.

Es bien conocido que los carcinógenos inducen recombinación, mutación y amplificación del ADN. (Pfister, 1987) y la persistencia del genoma de los PVH puede intervenir en este efecto. En suma, los carcinógenos pueden actuar en los genes celulares envueltos en el control del genoma de los PVH ó los que por si mismos están sujetos a las funciones de los papilomavirus. Finalmente, los carcinógenos pueden activar genes que complementan o suplementan las funciones virales.

INCIDENCIA.

El tipo de papilomavirus que está asociado a lesiones benignas y malignas, hace pensar en la posibilidad de que el virus, es un factor importante en la transformación maligna. Así por ejemplo zur Hausen y colaboradores (1977) encontraron que PVH 6 y PVH 11 son los más comunmente detectados en

Condiloma Acuminata (Gissmann et al, 1983) y displasias cervicales, mientras que los PVH 16 y 18 son los más frecuentemente encontrados en cáncer cervical. (Boshart, 1984). Se ha visto también que la frecuencia y distribución de diferentes tipos de PVH varía de acuerdo con la localización geográfica. (Gissmann et al, 1982).

Los PVH 6 y 11 son considerados como oncógenos no potenciadores o leves en el cáncer de cervix. En contraste con la infección de PVH 16 y 18, que resulta generalmente en una proliferación epitelial con una fuerte probabilidad de desarrollo en el carcinoma escamoso invasivo o adenocarcinoma.

PVH tipo 16 ha sido detectado en un 40 a 60 %, mientras que PVH tipo 18 en un 10 a 20 % de cáncer cervical, (Durst et al, 1983; Boshart et al; 1984. Riou et al, 1985; Cole, 1987)

En México, la incidencia de cáncer cervico-uterino es extremadamente alta ya que corresponde aproximadamente de un 34 % de los tumores malignos en la mujer (Ocadiz et al, 1987); entre éstos el más frecuente es el carcinoma epidermoide escamoso invasivo y en su mayoría, se encuentra en los estadios II o III de malignidad (Gariglio, 1987)

En nuestro país, se han realizado estudios a nivel molecular de muestras de tumores de cáncer cervico-uterino,

en donde se encontraron secuencias de papilomavirus tipo 16 en un 31 % de las muestras analizadas (Gariglio, 1987; Alvarez, 1988 resultados no publicados). Sin embargo, anteriormente no se habían realizado trabajos en cáncer cèrvico -uterino detectando PVH tipo 18.

OBJETIVOS:

-Detectar secuencias de Papilomavirus Humano tipo 18 en
Cáncer Cervico-Uterino.

-Determinar la forma de integración de Papilomavirus Humano
tipo 18 en las muestras de Cáncer Cèrvico Uterino

MATERIAL Y METODOS.

El primer paso de la metodología empleada fué la obtención del ADN de muestras de tumores en diferentes estadios de malignidad, posteriormente el ADN se digirió con enzimas de restricción que cortan en sitios del genoma de PVH-18, (ver fig 1) así como también con enzimas que no presentaran sitios de corte en el ADN viral. Como paso siguiente, las digestiones se sometieron a electroforesis con sus respectivos controles y marcadores moleculares.

Después se transfirió el ADN del gel, a un soporte sólido por medio de la técnica de Southern (1975) para posteriormente hibridarla contra sondas radioactivas de fragmentos de PVH-18 que contienen diferentes regiones de su genoma (ver figura 1). El papel se expuso a una placa de radiografía para observar las señales positivas del PVH-18. (Ver fig 2).

EXTRACCION DE ADN A PARTIR DE TEJIDOS.

Las muestras de tumores obtenidas de pacientes con diferentes estadios de CaCU se almacenaron a -20 grados centígrados, y cuando fué necesario realizar la extracción de

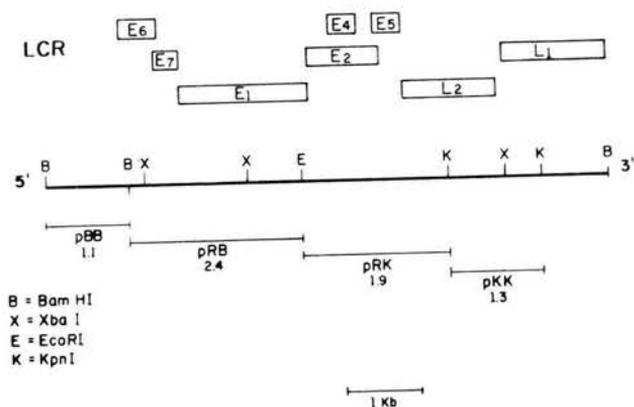


Fig 1. Mapa genético de Papilomavirus Humano tipo 18. LCR = región control, E = marcos de lectura abierta tempranos, L = marcos de lectura abiertos tardíos. pBB = fragmento BamHI/BamHI. pRB = fragmento BamHI/EcoRI. pRK = fragmento EcoRI/KpnI, pKK = fragmento KpnI/KpnI de PVH-18.

METODOLOGIA

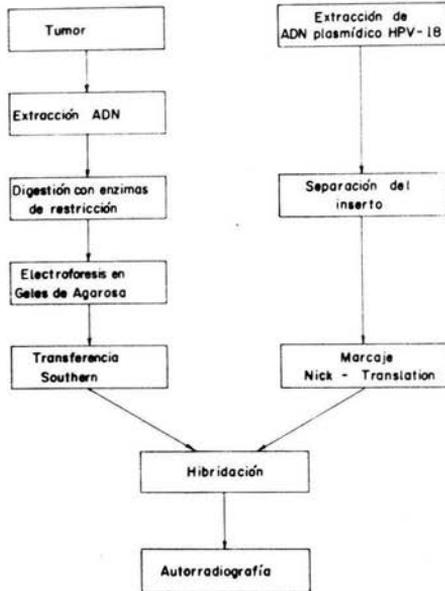


Fig 2. Diagrama de la estrategia experimental seguida para realizar la detección y caracterización de secuencias de PVH-18 en muestras de cáncer cervico-uterino.

ADN celular se tomó una porción, la cual se colocó en un homogenizador (Potter), que contenía previamente una solución tampón TE (tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1mM) fría. Una vez en el homogenizador, el tejido se disgregó por la acción mecánica dejando libres a las células.

Posteriormente se realizaron lavados con solución de (NaCl 10mM, EDTA 10mM) y se sometió la pastilla a un tratamiento con 14 ml de hidrocloreuro de guanidina 6M, 1 ml de sarkosyl de sodio al 20 %, 1 ml de acetato de amonio 7.5 M y 150 ul de proteinasa K 10mg/ml; dejando incubar 1 hora a 60 grados centígrados.

El hidrocloreuro de guanidina permite la lisis celular al ser un fuerte agente caotrópico y el sarkosyl de sodio debido a que es un detergente aniónico, rompe la tensión superficial al interactuar con la bicapa lipídica de la membrana celular. Mientras que la proteinasa K actúa digiriendo las proteínas, dejando de esta forma libre el ADN celular.

El ADN se precipitó al añadir 35 ml de etanol absoluto a temperatura ambiente, se recogieron las fibras de ADN con una micropipeta con punta recortada y se dejó resuspender en 1ml de solución tampón TE (Jeanpierre, 1987. Bowtell, 1987).

EXTRACCION DEL ADN PLASMIDICO.

Se dejó crecer una colonia de la bacteria que contenía

el plásmido (fragmentos de PVH-18), en 5ml de medio luria toda la noche a 37 grados centígrados en agitación constante (200 rpm). El cultivo se agregó a 1 litro de medio luria y posteriormente se le adicionó cloranfenicol a una concentración final de 170ug/ml y se dejó incubar 14 horas a 37 grados centígrados a 200 rpm. El cloranfenicol inhibe la síntesis de proteínas y esto provoca que la replicación del plásmido continúe y se amplifique, mientras que la replicación del ADN cromosomal cesa (Maniatis, 1982).

Posteriormente se centrifugó el cultivo 10 min. a 10000 rpm en un rotor sorvall SS34 a 4 grados centígrados; la pastilla obtenida se resuspendió en 40 ml de sol 1 (50 mM de glucosa, 10 mM de EDTA, 25 mM de tris-HCl pH 8), más 5 mg/ml de concentración final de lisozima; la cual va a provocar la lisis bacteriana al hidrolizar los enlaces β (1 \rightarrow 4) glucosídicos del esqueleto polisacárido del peptidoglucano de la pared celular. (Lehninger, 1984). Como siguiente paso se añadió 80 ml de sol 2 (0.2M de Na OH, 1 % de SDS), y se agitó suavemente; se incubó 5 min. hasta que la solución se tornó clara. Para realizar la separación del ADN plasmidico, se adicionó un álcali ligero como es el acetato de sodio (80 ml, 5 M, ph 4.5), el cual junto con el SDS y el hidróxido de sodio ocasionan la ruptura de la mayoría de los puentes de hidrógeno del ADN celular. Entonces se agitó suavemente y se incubó en hielo 15 min.

Posteriormente se centrifugó 10 min. a 10000 rpm a 4 grados centígrados, se decantó el sobrenadante através de un filtro de gasa y se desechó la pastilla. Se añadió 2 volúmenes y medio de alcohol absoluto frío al sobrenadante filtrado; Se centrifugó 10 min. a 10000 rpm a 4 grados centígrados, para precipitar el ADN. Como paso siguiente se dejó secar la pastilla, eliminando el sobrenadante para después resuspender en 3ml de sol. TE. (Maniatis, 1982).

PURIFICACION DEL ADN PLASMIDICO POR GRADIENTES DE ClCs.

Para purificar el ADN del plásmido se somete la muestra a centrifugación isoplénica de equilibrio utilizando cloruro de cesio, el cual produce un gradiente de concentración de la sal y por tanto un gradiente de densidad que se forma debido a la gran masa del ión cesio, de ésta forma se organiza la redistribución de las moléculas y la banda que corresponde al ADN plasmidico se puede visualizar por efecto del colorante bromuro de etidio al entrar en contacto con la luz UV. (Bryan, 1981 y Maniatis, 1982).

A 3 ml de ADN disuelto en TE pH 8 se le añadió 3 gr. de ClCs y se disolvió en tubos de polialómero. Posteriormente se le agregó 400 ul de bromuro de etidio 10mg/ml y se centrifugó 40 horas a 20 grados centígrados a 40000 rpm en un rotor

Beckman SW50.1 sin freno. Al término de la corrida se separó la banda correspondiente al ADN utilizando luz UV y la ayuda de una jeringa, se colectó la muestra y se agregó un volumen de Butanol saturado con TE y se rescató la fase acuosa con la muestra. Este paso se puede repetir hasta que pierda el colorante. Posteriormente se separó la muestra y se dializó contra TE toda la noche para posteriormente cuantificar la cantidad de ADN en un espectrofotómetro. Finalmente, se precipita el ADN con 2 volúmenes y medio de etanol absoluto y medio volumen de acetato de amonio 7.5M pH 7.5. Para después resuspender en solución TE (Maniatis, 1982).

ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

La separación de moléculas através de un soporte inerte como la agarosa, se realiza al someterla a un campo eléctrico en donde la migración va a depender, de la masa y la carga de la molécula misma. El corrimiento de la muestra se puede visualizar en el gel de agarosa, empleando un colorante como es el bromuro de etidio al colocarlo en una fuente de luz ultravioleta.

El ADN se puede fragmentar previamente al corrimiento electroforético empleando enzimas de restricción las cuales van a interactuar con un sitio o secuencia específico.

Se pesaron 2 gramos de agarosa tipo 11 (Sigma), y se le agregó 250 ml de sol TBE (Tris-HCl 90mM; Acido Bórico 90mM; EDTA 2mM), posteriormente se disolvió en una fuente de calor dejándose gelificar en un carro para electroforesis con su respectivo peine. El gel fué colocado en una cámara de electroforesis que contenía previamente 1000 ml de sol. TBE con .05 ug/ml de bromuro de etidio. Se colocaron cada una de las muestras con colorantes indicadores de corrida (azul de bromofenol 0.02 %, xilencianol 0.02 % y glicerol al 50 %). Entonces se dejaron correr las muestras del gel a 50 volts toda la noche, y visualizar posteriormente las bandas en la luz ultravioleta.

PURIFICACION DE FRAGMENTOS DE ADN A PARTIR DE GELES.

Como paso inicial se realizó la digestión del ADN utilizando las enzimas correspondientes para separar el fragmento de interés, del vector. Después se corrió el gel con la muestra (electroforesis en geles de agarosa), se visualizó la banda y se realizó un corte justo enfrente de ella. Previamente se dejó remojar tiras de papel Whatman DE 81, en sol de NaCl 2.5 M 3 horas y se almacenó en sol 1M de EDTA a 4 grados centígrados; para colocar justo en la incisión realizada, una tira de papel Whatman tratada. Como

paso posterior se reanudó la corrida hasta que las bandas ingresaron al papel, se recuperó éste y fué lavado con agua bidestilada y después se dejó secar al ambiente. Entonces se colocaron las tiras de papel en un tubo eppendorf de 0.5 ml y se le añadió 300 ul de tris-HCl 20 mM pH 7.5; EDTA 1mM, NaCl 1.5 mM., para posteriormente agitar con la ayuda de un vortex y dejar incubar 2 hrs a 37 grados centigrados con agitación ocasional. Al haber transcurrido éste tiempo se le realizó un orificio en el fondo del tubo eppendorf y se colocó dentro de otro tubo eppendorf de 1.5 ml sin tapa; es entonces cuando se centrifugó 10 min. a 10 K rpm. El líquido obtenido se sometió a tratamiento con butanol saturado con TE y después se precipitó el ADN con etanol absoluto frío. (Dretzen et al, 1981).

METODO DE TRANSFERENCIA DE ADN (SOUTHERN BLÖT)

El método consiste en transferir el ADN que ha sido fragmentado por electroforesis a un soporte sólido como es el papel de nitrocelulosa (Southern, 1975).

El gel con la muestra de interés se sumergió en una solución de HCl .25 N durante 15 minutos, para que posteriormente se sometiera a un tratamiento desnaturalizante (NaOH 0.5M; NaCl 1.5 M), durante 30 minutos en dos ocasiones.

lo cual permite la separación de las dos cadenas componentes del ADN celular. Posteriormente se lavó en dos ocasiones durante 30 min. con una solución de (Tris-HCl 1M pH8, NaCl 1.5 M) para neutralizar y dar las condiciones adecuadas al ADN para la transferencia. Como paso siguiente se colocó el gel encima de una larga pieza de papel Whatman 3 MM, que estaba en contacto con una solución SSC 10X (NaCl 1.5 M, citrato de sodio 0.15 M pH 7) y que sirve como puente entre el gel y la solución. Luego, se colocó el papel de nitrocelulosa sobre el gel y encima de éste, 2 papeles Whatman 1MM. Como siguiente paso se puso una cantidad considerable de papel absorbente sobre todo el dispositivo anterior y sobre todo el montaje un peso de alrededor de 500 gr. se dejó transferir de 16 a 24 hrs. Este dispositivo permite que por capilaridad, así como por la acción de la alta fuerza iónica, el ADN celular fragmentado sea transferido al soporte sólido (Southern, 1975). Como último paso al término de la transferencia, el papel se enjuagó en SSC 2X y se horneó al vacío a 80 grados centígrados durante 2 horas.

MARCAJE DEL ADN. (METODO DE NICK- TRANSLATION)

El método de nick-Translation se basa en el empleo de dos enzimas, la ADNasa I y la ADN polimerasa I. La enzima

ADNasa I va a ocasionar la ruptura del ADN en pequeños espacios (Nicks) y con su actividad exonucleasa 5' - 3' la ADN polimerasa I va desplazando los nucleótidos en los extremos 5' en los espacios creados. Al mismo tiempo en presencia de desoxinucleótidos marcados con fósforo 32 se realiza la incorporación de éstos nucleótidos por la actividad 5'-- 3' polimerasa de la enzima. De ésta manera el espacio abierto por la ADNasa I se va desplazando por toda la secuencia incorporándose el nucleótido marcado. (Wain-Hobson, 1983)

Se contó con kits comerciales (BRL o Amersham), y el método consistió en lo siguiente: A 1 ug de ADN en 5 a 10 ul de volumen se le agregó 20 ul del regulador que contenía los nucleótidos (dATP, dGTP y dTTP) y cofactores enzimáticos (Cloruro de magnesio, tris-Hcl pH 7.9 , NaCl) para posteriormente añadir las enzimas ADAsa I y ADN polimerasa I, junto con el dCTP fosforo 32 (Amersham) llevando a un volumen final de 100 ul utilizando agua bidestilada para completar. Fue entonces cuando se dejó incubar a 17 grados centígrados durante 2 hrs. La mezcla de reacción se pasó através de una columna cromatográfica de sephadex G 50 para realizar la separación de el nucleótido marcado y la porción no incorporada. La actividad especifica del ADN marcado usualmente es de 50 a 200 millones de cpm/ ug de ADN.

HIBRIDACION DEL ADN CELULAR.

La hibridación se realiza una vez que la transferencia del ADN se ha llevado a cabo. El filtro de nitrocelulosa se prehibrida con anterioridad para bloquear los sitios no ocupados por el ADN. Se añadió 20 ml de sol. prehibridadora a un papel de 19 X 14 cm; la solución contiene: formamida al 50 %, sol. Denhart 5 X (Polivinilpirrolidona 0.02%, BSA 0.02%, ficoll 400 0.02 %), SSPE 6X (Solución salina Fosfato EDTA), SDS final 0.1 %, ADN de esperma de salmón 1 mg /ml, agua bidestilada cbp 20 ml. Una vez el papel sellado en su bolsa y con la sol. prehibridadora, se dejó incubar de 24 a 72 horas a 42 grados centígrados, con agitación ocasional. Posteriormente, a 11 ml de la sol. anterior se añadió la sonda marcada radioactivamente y se incubó alrededor de 24 horas a 42 grados centígrados. Como último paso se sometió el papel a lavados a baja astringencia primeramente (2 lavados de 15 min, con una sol. SSC 2X, SDS 0.1 % a 55 grados centígrados.), y después a lavados a alta astringencia para evitar uniones no específicas y encontrar secuencias altamente homólogas, bajo las siguientes condiciones (2 lavados de 15 min. con sol. SSC 0.1 X , SDS 0.1 % a 65 grados centígrados).

RESULTADOS

Se sondearon 14 muestras de cáncer cervical en diferentes estadios de malignidad, así como ADN de tejidos cervicales normales. En la fig 3a, se observa el corrimiento electroforético de diferentes muestras de ADN (6 ug/carril). Se realizaron digestiones totales con la enzima EcoR1, que corta una sola vez el genoma de PVH-18, la hibridación del papel resultante de la transferencia se realizó empleándose como sonda el fragmento purificado pRB de HPV-18, el cual contiene el MLA E6, E7 y casi la totalidad de E1 (ver fig 1) Se detectaron señales positivas de alto peso molecular, en los carriles con el ADN tumoral sin digerir, y también bandas bien definidas en los estadios IIIB-E; 2 bandas que comigran de 6.0 pKb y otra de 4 pKb, sin embargo se distinguen bandas claras en los estadios Inv-E y IVB-E de 6.0 pKb (ver fig 3b). Es importante mencionar que no se obtuvo señal alguna en los carriles de controles negativos (ADN de tejido normal cervical y ADN de PVH-16).

En la figura 3 c se observan las bandas que permanecieron en condiciones de lavado de baja astringencia panel A y alta astringencia panel B, correspondientes a los estadios IIIB-E.

Posteriormente, 3 de las muestras positivas del papel

a)

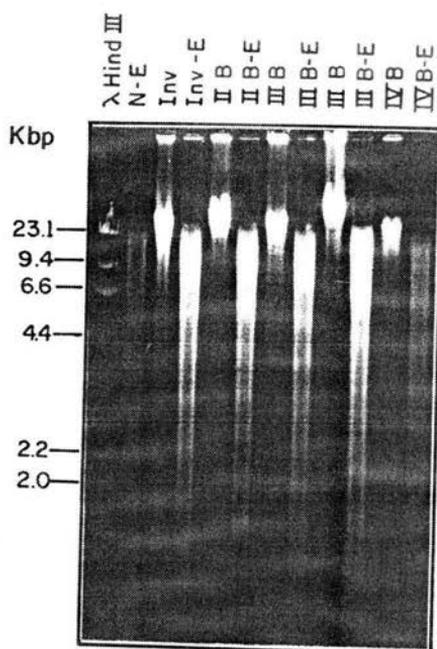
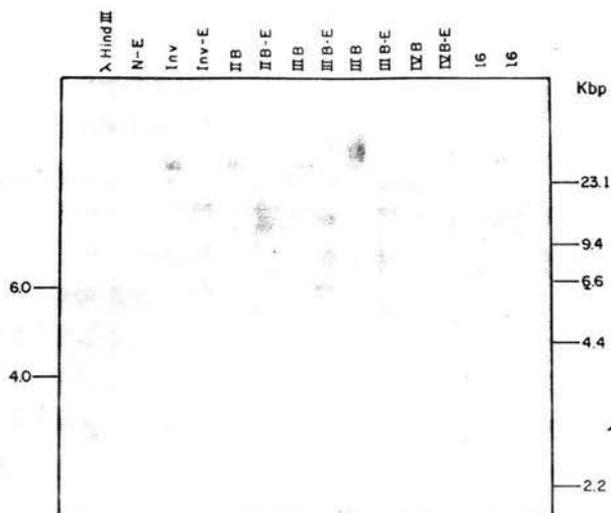
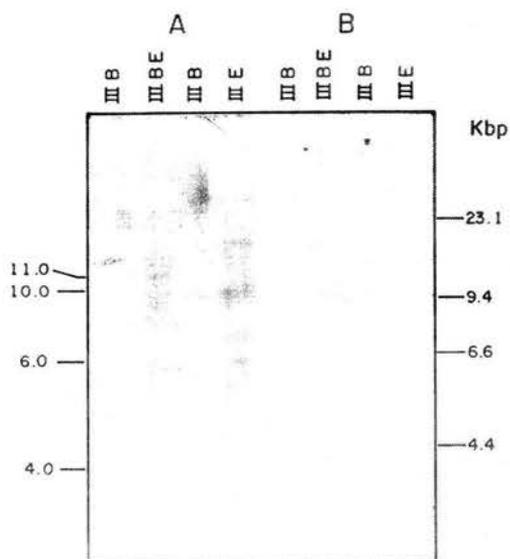


Fig 3. (a) Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de ADN de muestras de tumores de diferentes estadios de malignidad sin digerir y cortados con EcoR1. (b) Hibridación de ADN tumoral sin digerir y cortado con EcoR1. contra el fragmento pRB de PVH-18, en condiciones de baja astringencia. (c) Hibridación de ADN de 2 muestras de tumor estadio IIIB en condiciones de baja astringencia A, y alta astringencia B contra el fragmento pRB de PVH-18. HindIII = marcador de peso molecular, N = ADN de tejido de cervix normal, Inv = estadio invasivo, II B, III B y IV B son diferentes estadios de malignidad de CaCU.

b)



c)



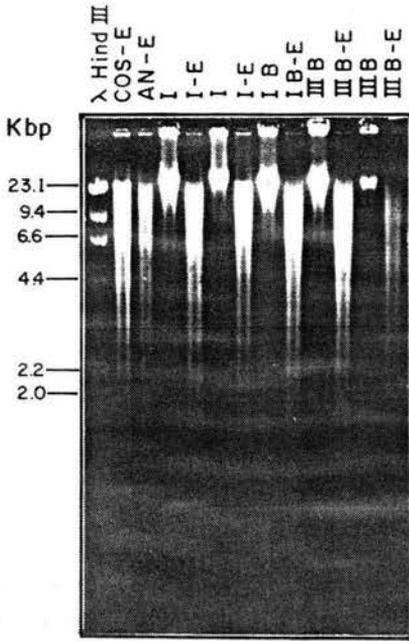
anterior (Inv. III B y IV B) se cortaron con la enzima HindIII (no tiene sitio de corte en el genoma de PVH-18) para estudiarlas más a fondo y se hibridaron con el fragmento pBB de PVH-18 que contiene la región control más el final del MLA L1 e inicio de E6 y con el fragmento pKK que contiene MLA L2 y L1 (ver fig 1), no observándose señal alguna para ninguno de los dos fragmentos de PVH-18 (Datos no mostrados).

Los MLA más conservados entre los diferentes papilomavirus son: E1, E2 y L1; mientras que los menos conservados son: LCR, E4, E5 y L2 (Chow, 1987; Pfister, 1987). Tomando en cuenta lo anterior podemos decir que utilizando la sonda de pRB hay más probabilidad de encontrar señales cruzadas con otros papilomavirus asociados a PVH-18 como son PVH-10, 32 y 45 (Pfister, 1987; Zohreh et al, 1987); debido a que pRB tiene la región del E1 que es muy común entre los PVH. Sin embargo el fragmento pBB al tener la región del LCR siendo ésta la zona en la que difieren más los distintos tipos de PVH (Lazo, 1987), se espera que la señales dadas en la hibridación empleando éste fragmento sean auténticamente señales de PVH-18. Así pues, las muestras utilizadas en el experimento anterior no corresponden a PVH-18, sino algún tipo de papilomavirus relacionado con éste.

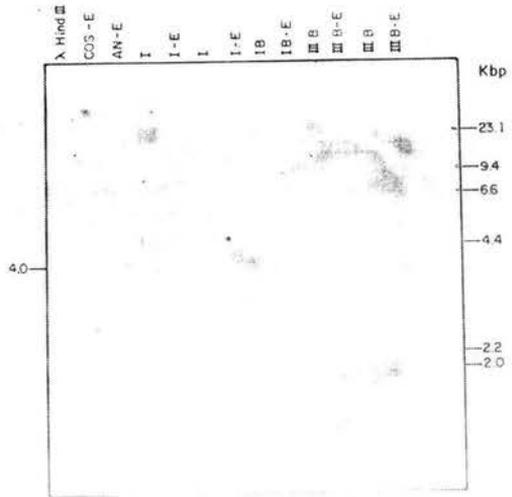
En la fig 4 a, se observa ADN de diversos tumores, así como tejido de cervix aparentemente normal y células COS (Células de riñón de mono transformadas con SV40). Las

Fig 4. (a) Electroforesis en gel de agarosa al 1 % de ADN de muestras de tumor sin digerir y cortado con EcoR1 (b) Hibridación de ADN de tumor de diferentes estadios de malignidad contra el fragmento pRB de PVH-18, en condiciones de baja astringencia. Hind III = marcador de peso molecular, E = digestión con EcoR1, COS = ADN de células de riñón de mono transformadas con SV40 AN = ADN de muestra de tejido cervical aparentemente normal; I, IB, IIIB = diferentes estadios de malignidad de CaCU.

a)



b)



digestiones realizadas con EcoR1 fueron completas y la cantidad de ADN en cada pozo fuè de 6 ug. En la fig 4 b, se observa la hibridaciòn de las muestras con el fragmento pRB de PVH-18 en condiciones de baja astringencia, en donde se encuentran se~ales de alto peso molecular en los carriles de ADN sin digerir, así como el ADN de células COS y en una muestra de tumor estadio IIIB digerido con EcoR1 de aproximadamente 4.0 pKb. Sin embargo cuando se somete el papel a lavados a alta astringencia se pierde completamente la se~al. Posteriormente èste mismo papel se hibridò con PVH-16 encontrándose algunas se~ales positivas aún en los lavados de alta astringencia, por lo que podemos deducir que no existe PVH-18 en las muestras analizadas y que las bandas que se observaron al hibridar con pRB a baja astringencia fueron se~ales cruzadas de otro tipo de papiloma, pues no permanecieron en los lavados a alta astringencia.

En la fig 5a, se observan ADN de diferentes tumores así como de células SW13.1 (Células de adenocarcinoma adrenocortical humano), ADN de tejido de cèrvix normal y ADN de células HeLa con PVH-18 integrado; también se aprecian las digestiones completas de ADN con la enzima EcoR1, la cantidad de ADN es de 6 ug/ carril. En la figura 5b, se observa la hibridaciòn de las muestras anteriores, con el fragmento pBB de PVH-18 en condiciones de lavado de baja astringencia; en donde se detectò una se~al difusa positiva en la muestra de

a)

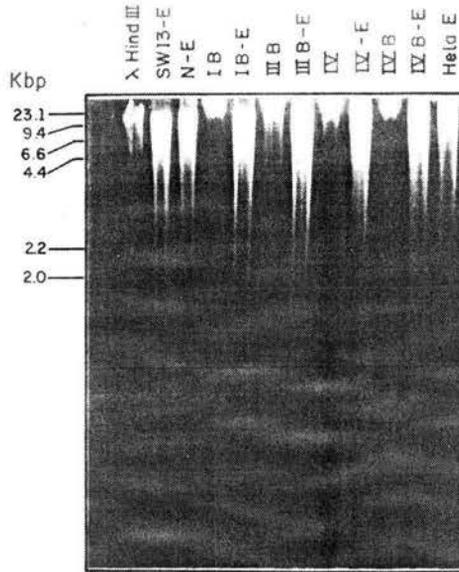
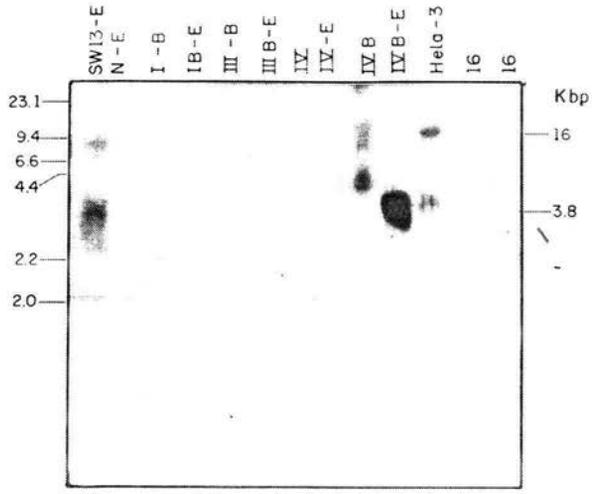
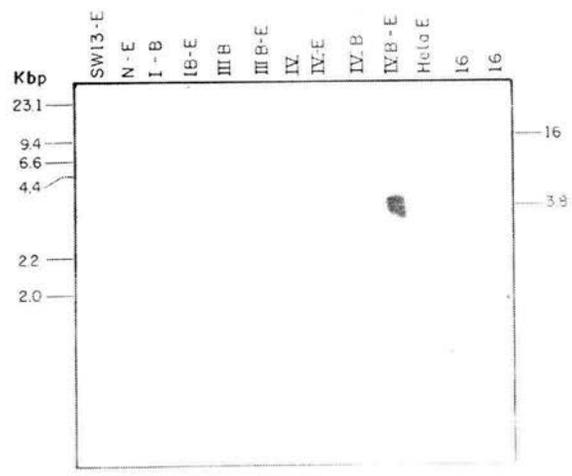


Fig 5. (a) Electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % de ADN de tumores en diferentes estadios de malignidad. (b) Hibridación de ADN de tumores contra el fragmento pBB de PVH-18 en condiciones de baja astringencia (SSC 2X, SDS 0.1 %, 55 C). (c) Hibridación de ADN de tumores contra el fragmento pBB de PVH-18 en condiciones de alta astringencia (SSC 0.1 X, SDS 0.1 %, 65 C). HindIII = marcador de peso molecular, E = EcoRI, SW13.1 ADN de células de adenocarcinoma adrenocortical humano, HeLa = ADN de células de carcinoma cervical humano con PVH-18 integrado; N = células de tejido cervical normal, 1B, III B, IV, IV B, son diferentes estadios de malignidad de las muestras de ADN tumoral. 16 = ADN de PVH-16.

b)



c)



tumor estadio IVB sin digerir. En el digerido con EcoR1, se aprecia una señal bastante fuerte de aproximadamente 3.8 pKb, que permanece aún con los lavados a alta astringencia (fig 5 c), al igual que permanece la señal del ADN de células HeLa (control positivo). Para estudiar más a fondo su patrón de restricción; la muestra IVB que dió señal positiva y las células HeLa, se cortaron con otras enzimas como HindIII, la cual no tiene sitio de corte en el PVH-18, doble digestión con HindIII-EcoR1 y por último con BamHI que tiene 2 sitios de corte para PVH-18. (Ver fig 1 y 6); encontrándose que en la hibridación con el fragmento pBB el ADN de células HeLa digerido con EcoR1 da una banda de 16.7 pKb, IVB digerida con Eco R1, una banda de 3.8 pKb; HeLa HindIII una banda de 6.1 pKb, IVB digerida con HindIII una banda de 3.8 pKb; HeLa digerida con EcoR1/HindIII una banda de 5.4 y otra de 7.6 pKb, IVB digerida con EcoR1/HindIII una banda de 1.5 pKb, HeLa digerida con BamHI da una banda de 6.1 pKb y IVB BamHI una banda de 1.1 pKb. El patrón de corte del ADN de células HeLa y la muestra de tumor IVB son diferentes y las señales persisten aún con los lavados de alta astringencia (ver fig 6). Así las bandas identificadas corresponden a ADN integrado del PVH-18.

En la tabla 1 se puede observar en una forma resumida los resultados de hibridación con los fragmentos pRB y pBB de PVH-18 contra las muestras de ADN tumoral, encontrándose que

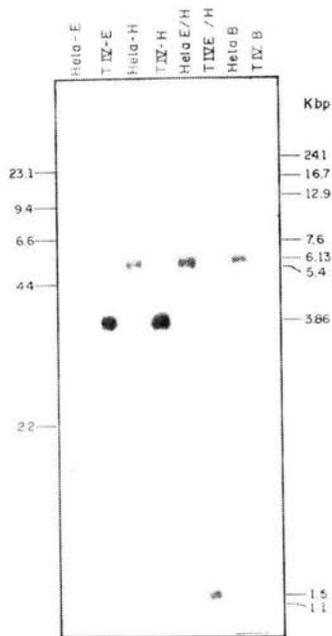


Fig 6. Hibridación de ADN de tumor estadio IVB y cel HeLa contra el fragmento pBB de PVH-18 en condiciones de alta astringencia. HinIII = marcador de peso molecular, E = EcoRI, H = HindIII, B = BamHI, SW13.1 = ADN de células de adenocarcinoma adrenocortical humano, HeLa = ADN de células carcinoma cervical humano con PVH-18 integrado.

Estadio Astringencia		I	II	III	IV	INV	TOTAL
Baja	pRB	0/4	0/1	3/5	1/3	1/1	5/14
	pBB	0/4	0/1	0/5	1/3	0/1	1/14
Alta	pRB	0/4	0/1	2/5	0/3	0/1	2/14
	pBB	0/4	0/1	0/5	1/3	0/1	1/14

Tabla 1. Señales positivas a baja y alta astringencia utilizando sondas de fragmentos de PVH-18 en diferentes estadios de malignidad de cáncer cèrvico uterino.

con el fragmento pRB, 2 de 14 muestras analizadas dieron señales positivas, siendo éstas algún tipo de PVH relacionado a PVH-18 y solamente 1 muestra de ADN de 14 analizadas hibridó con el fragmento pBB de PVH-18 aún con los lavados a alta astringencia, lo que sugiere que en realidad se trata de PVH-18. Al analizar el patrón de restricción e hibridación de ésta muestra, se encontró que el PVH-18 estaba integrado en el ADN celular por lo que se elaboró un posible modelo de integración, (ver fig 7) en el cual se supone se encuentran las secuencias pertenecientes a toda la región control (LCR), el MLA E6 y parte del MLA E7.

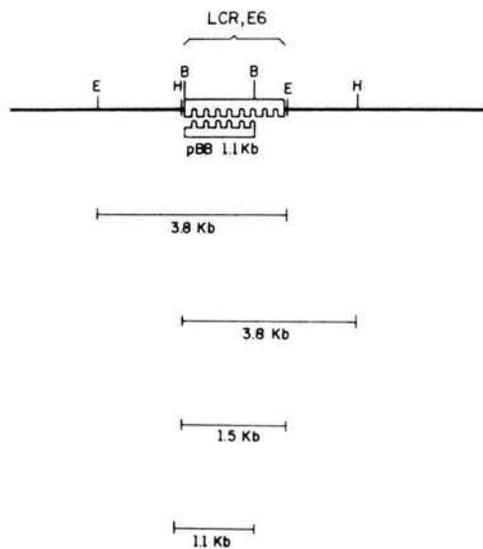


Fig 7. Modelo de integración del PVH-18 en el ADN del tumor estadio IVB. E = sitio EcoR1, B = sitio BamH1, H = sitio HindIII.

DISCUSION

En la tabla 1 se representa que el 7 % de las muestras estudiadas contienen ADN del PVH-18. Para determinar el estado físico del ADN viral se realizaron análisis más profundos utilizando diferentes enzimas de restricción. Al hidrolizar la muestra de tumor IVB con la enzima BamHI y sondear con el fragmento pBB de PVH-18 el cual presenta el LCR, inicio de E6 y fin de L1 (ver fig 1), se detecta una banda que corresponde al tamaño de la sonda utilizada (ver fig 6); por lo que se puede suponer se encuentran presentes las secuencias del fragmento pBB de PVH-18. Por otra parte al cortar con la enzima HindIII (la cual no tiene sitio de corte en el genoma de PVH-18) y también con EcoRI (que tiene 1 sitio de corte al final de E1 de PVH-18), se detecta una banda del mismo peso molecular en ambos casos, por lo que se supone, se encuentran 2 sitios de corte para HindIII en el genoma celular adyacente a la integración. Uno muy cercano al inicio de las secuencias integradas de PVH-18 y el otro a 2.7 pKb de el extremo opuesto a la integración. Así mismo los sitios EcoRI en el genoma celular deben guardar un patrón similar al descrito para HindIII, pero en sentido inverso; de tal forma que un sitio HindIII se encontraría muy cerca de un extremo de las secuencias virales y un sitio EcoRI muy

cercano al extremo opuesto.

Al realizar la doble digestión del ADN tumoral con EcoR1/HindIII, se detectó una banda de bajo peso molecular correspondiente a las secuencias virales integradas, es decir el LCR, E6, inicio de E7 y fin de L1.

Se ha observado que cuando el PVH-18 se encuentra integrado en el genoma celular ocurre un rompimiento del ADN viral a nivel del MLA E2, el cual codifica un factor transregulador que se une a un potenciador localizado en la región control y actúa activando ó reprimiendo la transcripción (Schwarz, 1986). De tal forma que la pérdida de la función de E2 podría conducir a la transformación y malignidad (Chou-Chi, 1988). O bien al perder el efecto regulatorio que ejercía el MLA E2, se colocaría el PVH-18 en una nueva situación regulatoria en donde el efecto de los productos celulares ó el nuevo ADN humano flanqueante pudieran jugar un papel importante en la carcinogénesis.

La integración del ADN viral en el genoma celular puede resultar en una variedad de situaciones por las cuales la expresión genética puede modificarse. Los efectos pueden ser a dos niveles: El efecto de las secuencias humanas en los genes virales y el efecto de las secuencias virales en el ADN humano (Lazo, 1987). Si añadimos a esto la interacción de otros agentes ó factores oncogénicos como por ejemplo el cigarrillo o la radiación, PVH-16 y 18 posiblemente actúen

como iniciadores del proceso tumoral y el cigarrillo y la radiación promuevan el desarrollo de un tumor. Un posible papel de cofactores en la inducción de malignidad de los PVH, puede ser la activación de oncogenes transformantes ó inmortalizantes (Laimins, 1987).

El oncogene c-myc, se ha encontrado en muestras de Cáncer Cèrvico-Uterino, en un sitio cercano al PVH-16, de tal forma que se podría pensar que factores celulares transactivaran a los promotores de el PVH, de ésta manera se daría una mayor transcripción de c-myc por lo que hay una sobreproducción de RNAm de c-myc, una mayor promoción de la replicación y por lo tanto se dá el proceso de transformación. O bien puede suceder que por cis-activación de myc a PVH, promueva mayor transcripción de los MLA virales, mayor producción de RNAm de los MLA virales y como consecuencia de ésto, más producción de proteínas virales transformantes y por lo tanto el proceso de transformación (Alvarez, 1988).

La presencia de los MLA E6 y E7 integrados en el genoma celular, junto con la desregulación transcripcional del ADN viral ocasionada por la pérdida ó interrupción del MLA E2 y por la acción de los factores celulares en la región control del PVH-18, podrían ser los responsables de la transformación maligna celular. Puesto que, según estudios realizados con fibroblastos de ratón, los MLA E6 y E7 de los PVH-16 y 18

participan directamente en procesos de transformación celular (Inagaki, 1988; Schwarz, 1985; Watanabe, 1988).

La integración de la región control ó LCR viral en el genoma celular es de importancia ya que esta contiene el origen de replicación, secuencias que regulan la transcripción, promotores tejido específicos y elementos potenciadores ó enhancer, además de secuencias que interactúan con factores celulares trans-activadores que probablemente modulan la actividad transcripcional viral (Giri and Danos. 1986; Thierry, et al.1987; Lazo. 1988).

Las secuencias virales integradas pertenecientes a los MLA E6 y E7 de PVH-18 en ausencia de E2 probablemente puedan funcionar como un gene temprano transcripcionalmente activo.

CONCLUSIONES

El ADN de Paliomavirus Humano tipo 18, se detectó en un 7 % de las muestras analizadas encontrándose su genoma incompleto integrado en el ADN celular. La región detectada corresponde a los MLA E6, inicio de E7 y fin de L1; así como la región control completa. Se piensa que el PVH-18 juega un papel importante en la progresión maligna ya que los MLA E6 y E7 tienen actividad transformante y capacidad de cooperar con oncogenes activados (myc, ras). Los promotores de estos MLA transformantes se encuentran en la región control ó LCR que posee secuencias blanco de factores celulares de regulación transcripcional. De esta forma la expresión de E6 y E7 puede ser promovida en ausencia de los transreguladores transcripcionales virales como el MLA E2.

GLOSARIO

ADN desnaturalizado. ADN que ha pasado de la forma de doble filamento a la de filamento sencillo por la ruptura de los puentes de hidrógeno que unen a los dos filamentos complementarios.

ADN polimerasa. enzima responsable de la síntesis del ADN a partir de trifosfato de desoxirribonucleósido bajo la dirección de un filamento molde de ADN.

Astringencia. Fuerza iónica y temperatura en la que se permite la hibridación del ADN.

Cisactivación. Activación transcripcional de genes en la misma secuencia de ADN que los elementos de control.

Endonucleasa. Enzima que hidroliza enlaces fosfodiéster internos en un polinucleótido.

Enzima de restricción. Endonucleasa que reconoce secuencias de nucleótidos específicas en el DNA.

Fenotipo. Las características observables de un individuo, resultantes de la interacción entre el genotipo y el ambiente en el que ocurre el desarrollo.

Genoma. Contenido genético de una célula o virus.

Hibridación. Enlace de cadenas complementarias de ADN.

Marco de Lectura Abierta. Región comprendida entre un codón de iniciación y un codón de terminación.

Nucleótido. Unidad básica de la estructura del ADN, consta de tres partes, azúcar, base nitrogenada y un grupo fosfato.

Oncogene. Versión alterada de un protooncogene.

Plásmido. Molécula de ADN circular situado dentro de la célula huésped, que se replica independientemente de los cromosomas del huésped.

Protooncogene. Genes normales, los cuales codifican para proteínas que desempeñan funciones de gran importancia para las células.

Promotor. Lugar del ADN en donde se inicia la transcripción.

Potenciador. Secuencia de ADN que aumenta la transcripción de un promotor determinado.

Represor. Proteína que se une a una secuencia de la región control en el DNA y que por consiguiente, inhibe la transcripción de los genes adyacentes .

Transactivación. Regulación transcripcional de genes ubicados en secuencias de ADN distintas a los elementos de control.

Transcripción. La transferencia de la información genética codificada en la secuencia de nucleótidos del ADN a una secuencia de nucleótidos de una molécula de ARN.

APENDICE

ADN sonicado de esperma de salmón 10 mg/ml.

Colocar la cantidad deseada de ADN en agua bidestilada en ebullición, y agitar de 2 a 4 horas. Pasar varias veces por una aguja de jeringa calibre 18 y almacenar a 20 grados centígrados.

Bromuro de etidio 10mg/ml.

Pesar 1 gr. de Bromuro de etidio y añadir 100ml de agua dd. y agitar varias horas. Guardar en frasco ambar a 4 C.

EDTA 0.5 M

Pesar 168.1 gr. de EDTA dibásico, agregar 800 ml de agua dd. y ajustar el pH a 8 con NaOH. Aforar a 1 lt. Esterilizar en autoclave.

Solución Denharts 50 X.

5 gr de Ficcol 400, 5gr Polivinilpirrolidona, 5 gr. de Albúmina Sérica bovina; Disolver en 500 ml de agua dd. Esterilizar por filtración. Almacenar a 20 C.

Solución Salina Citrato 20 X (SSC)

175 gr de Cloruro de sodio, 98.2 gr de citrato de sodio, Disolver en 800ml de agua dd, y ajustar a pH 7, aforar a 1 lt y esterilizar por autoclave.

Solución TrisBoratosEDTA. 10 X (TBE)

108 gr. de Trizma base, , 55gr de Acido Bórico y 6.72 gr de

EDTA, agregar 800ml de agua dd, y ajustar pH 8 y aforar a 1 lt. Esterilizar por autoclave.

Solución Salina Fosfato EDTA (SSPE 20X)

Pesar 210.38 gr de NaCl, 27.6 gr Fosfato de Sodio monobásico y monohidratado, 2.72 gr de EDTA. Agregar 800 ml de agua dd.; ajustar pH 7.4 con NaOH. Aforar a 1 lt , esterilizar por autoclave.

TrisEDTA 10X (TE).

50ml de Tris pH 8 1M, 20 ml de EDTA 0.25 M, 430 ml de agua dd.

BIBLIOGRAFIA

Alvarez, S.L.M.; (1988). Analisis molecular de inserciones del virus Papiloma Humano (VPH) en el oncogene c-myc de tumores Cervico-Uterinos. Tesis de Licenciatura ENEPI-UNAM. pp 64-71.

Ambrose, E.J.C. y Roe, D.M. (1975). Biology of Cancer. 2a edici3n. Ellis Horwood Limited. Great Britain pp 1-2.

Baker, C.C.; et al. (1986). Structural and transcriptional analysis of Human Papillomavirus type 16 sequences in Cervical Carcinoma Cell Lines. Journal of Virology 4: 962.

Beaudenon, S.; et al. (1987). Plurality of genital Human Papillomaviruses: Characterization of two new types with distinct biological properties. Virology 161:374.

Bishop, J.M.; (1983). Cellular Oncogenes and Retroviruses. Ann. Rev. Biochem. 52: 301.

Boshart, M.; et al. (1984). A new type of papillomavirus DNA its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO Journal. 3: 1151.

Bowtell, D.D.L. (1986). Rapid Isolation of Eukaryotic DNA. Analytical Biochemistry 162:463.

Bryan, L.W. y Wilson, K. (1981). Principios y t3cnicas de Bioquímica Experimental. Editorial Omega. Espa1a. pp 38-39.

Cole, S.T. y Danos, O. (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the Human Papillomavirus type 18

genome. Journal Molecular Biology. 193: 599.

Chou-Chi, H.L.; et al. (1987). Identification of the Human Papillomavirus E2 protein in genital tract tissues. Journal of virology. 2: 606.

Chow, L.T.; et al. (1987). Human Papillomavirus Gene Expression. Cancer Cells 5: 55.

Crum, P.; et al. (1985). Cervical Papillomavirus Segregate within morphologically Distinct Precancerous Lesions. Journal of Virology. 3: 675.

Doobar, J.; et al. (1986). Identification of the Human Papillomavirus 1a E4 gene products. EMBo Journal. 5: 355.

Dretzen, G.; et al. (1981). A New and Reliable Method for Extract DNA From Agarosa and Acrylamide Gels. Anal. Biochem. 112: 295.

Durst, M.; et al. (1983). A Papillomavirus DNA from a Cervical Carcinoma and its prevalence in Cancer biopsies samples from different geographic regions. Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 3812.

Durst, M.; et al. (1985). The Physical State of Human Papillomavirus type 16 DNA in Benign and Malignant genital tumors. J. gen. Virol. 66: 1515.

Durst, M.; et al. (1986). Integration and persistence of Human Papillomavirus DNA in genital tumors. In Peto, R y Zur Hausen, H. (ed) Viral Etiology of Cervical Cancer. CSH Laboratory Banbury Report 21. USA.

Gariglio, P.; et al. (1987). Human Papillomavirus DNA sequences and C-myc oncogene alterations in Uterine-Cervix Carcinoma. *Cancer Cells*. 5: 343.

Gariglio, P.; et al. (1987). Theoretical Model for the Post-transcriptional Regulation of the Human c-myc Gene Expression, Involving Double-stranded RNA Processing. *J. Theor. Biol.* 125: 83.

Gissmann, L.M.; et al. (1984). Presence of Human Papillomavirus in genital tumors. *J. Invest. Dermatol.* 83: 26.

Gissmann, L.M.; et al. (1982). Molecular Cloning and Characterization of Human Papillomavirus DNA derived from a laryngeal Papilloma. *J. Virol.* 44: 393.

Gissmann, L.M.; et al. (1983). Human Papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomavirus and in some cervical cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80: 560.

Gissmann, L.M.; et al. (1986). Human Papillomavirus DNA in preneoplastic and Neoplastic genital lesions en Peto, R. y Zur Hausen, H. (ed) *Viral Etiology of Cervical Cancer*. CSH Laboratory Banbury Report 21. USA.

Gissmann, L.M. and Schwarz E.; (1986). In *Papillomavirus CIBA-GIEGY symposium 120*. Wiley Chinchester pp 190-197.

Gissmann, L.M.; et al. (1987). Human Papillomavirus and Cervical Cancer. *Cancer Cells*. 5: 275.

Giri, I., Danos O.; (1986). Papillomavirus genomes: from sequence data to biological properties. TIG- Reviews. 51: 227.

Howley, P.M.; et al. (1986). Molecular aspects of Papillomavirus-host cell interactions en Peto, R. y Zur Hausen H. (ed) Viral Etiology of Cervical Cancer. CSH Laboratory Banbury Report 21. USA.

Inagaki, Y.; et al. (1988). Nucleotide Sequences of cDNAs for Human Papillomavirus Type 18 Transcripts in HeLa Cells. Journal of Virology. 5: 1640.

Jablonska, S.; et al. (1972). Epidermodysplasia Verruciformis as a model in studies on the role of Papillomaviruses in oncogenesis. Cancer Res. 32: 583.

Jeanpierre, M.; (1987). Rapid Method for the DNA the blood extraction. NAR. 15: 22.

Laimins, L.A.; et al. (1987). Transformation of NIH-3T3 and primary rat embryo fibroblasts by Human Papillomavirus type 16 and type 18. Cancer Cell. 5: 201.

Lazo, P.A.; (1987). Integration of Papillomavirus DNA in HeLa Cell and its implications for tumorigenesis. Cancer Cells. 5: 359.

Lazo, P.A.; (1987). Structure, DNase I hypersensibility and expression of integrated papillomavirus in the genome of HeLa cells. Eur. J. Biochem. 165: 393.

Lazo, P.A.; (1988). Rearrangement of Both Alleles of

Human Chromosome 8 in HeLa Cells, One of them as a Result of Papillomavirus DNA Integration. The Journal of Biological Chemistry. 1: 360.

Lazo P.A.; (1988). Human Papillomaviruses in Oncogenesis. BioEssays. 9: 122.

Lehn, H.; et al. (1985). Papillomavirus genome in Human Cervical Tumors. Analysis of their transcriptional activity. Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 5540.

Lehninger L.; (1984). Bioquímica 2a.ed. Ed. Omega. España. pp 277-278, 958-963.

Lorincz, A.T.; et al. (1987). Oncogenic Association of specific Human Papillomavirus Types with Cervical Neoplasia. JINCI. 4: 671.

Maniatis, T.; et al. (1982). Molecular Cloning. A laboratory Manual CSH laboratory USA.

Nakabayashi, Y.S.; (1983). The transforming function of the bovine Papillomavirus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 5832.

Ocádiz, R.; et al. (1987). High correlations between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the Uterine Cervix. Cancer Research 47: 4173.

Pater, M.M. y Pater, A.; (1985). Human Papillomavirus Types 16 y 18 Sequences in Carcinoma Cell Line of the Cervix. Virology . 145: 313.

Pfister, H.; (1987). Human Papillomavirus and Genital Cancer. *Advances in Cancer Research* 48: 113.

Phelps, W.C.; (1987). Transcriptional trans-activation by the human papillomaviruses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 99: 111.

Picken, N.R. y Yang, H.L.; (1987). The integration of HPV-18 into HeLa cells has involved duplication of part of the viral genome as well as human DNA flanking sequences. *Nucleic. Acids Research.* 23: 10068.

Rassoulzadegan, M.A.; et al. (1982). The roles of individual polyomavirus early proteins in oncogene transformation. *Nature.* 300: 713.

Robbins, S.L. y Angell, M.; (1973). *Patologia Bàsica. Interamericana.*Mèxico. pp 3-22.

Rotkin, I.D. (1973). A Compararison Review of key Epidermological studies in Cervical Cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer.Res.* 33:1353.

Riou, G.E.;et al. (1985). Presence of Papillomavirus DNA sequences, amplification of c-myc and cHa-ras oncogenes and enhancer expression of c-myc in carcinoma of the Uterina Cervix. *UCLA Symp. Mol. Cell Biol. New Ser.* 32: 47.

Sarver, N.; et al.(1984). Localization and analysys of Bovine Papillomavirus type 1 transforming functions. *J. Virol.* 52: 377.

Schneider, A.; et al. (1987). Increased Prevalence of

Human Papillomaviruses in the lower genital tract of pregnant women. *Int. J. Cancer.* 40: 198.

Schwarz, E.; et al. (1985). Structure and transcriptions of Human Papillomavirus sequences in Cervical Carcinoma cells. *Nature.* 341: 111.

Schwarz, E.; et al. (1986). Expression of Human Papillomavirus DNA in Cervical Carcinoma Cell Line en Peto R. y Zur Hausen, H. (ed) *Viral Etiology of Cervical Cancer.* CSH Laboratory Banbury Report 21. USA.

Schwarz, E.; et al. (1987). Human Papillomavirus type-18 Transcription in Cervical Carcinoma cell Lines and in Human Cell Hybrids. *Cancer Cells.* 5: 47.

Shirasawa, H.; et al. (1986). Detection of Human Papillomavirus type 16 DNA and Evidence for Integration into the cell DNA in Cervical Dysplasia. *J. gen. Virol.* 67: 2011.

Southern, E.M.; (1975). Detections of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503.

Spalholz, B.A.; et al. (1985). Transactivation of a bovine papillomavirus transcriptional regulatory element by the E2 gene product. *Cell.* 43: 183.

Shimoda, K. and Lancaster, W.D.; (1987). Integration of Human Papillomavirus DNA sequences in Mild Cervical Dysplasias. *Cancer Cells.* 5: 349.

Thierry, F., et al; (1987). Elements that control the

Trascription of Genital Human Papillomavirus Type 18. *Cancer Cell*. 5: 23.

Wain, S.; et al. (1983). Constitution de banques d' ADN génomique a' l' aide de phages ou de cosmides. S'eminare technologique Inserm/Institut Pasteur. 118: 54.

Waterhouse, J.; et al. (1982). Cancer incidence in five Continens. IARC Lyon 4:

Yoshikawa, H.; et al. (1985). Ocurrence of Human Papillomavirus types 16 y 18 DNA in Cervical Carcinomas rom Japan Age of Patients and Histological type of Carcinomas. *Jpn. J. Cancer. Res.* 76: 8.

Zohreh, S.; et al. (1987). Characterizatio of Human Papillomavirus type 45, a new type 18-related Virus of the genital tract. *J. gen Virol.* 68: 3073.

Zur Hausen, H. (1977). Human Papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinoma. *Curr Top. Microbiol. Immunol.* 78: 1.