

2ej
12



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES ZARAGOZA

"Evaluación de la presencia de Papilomavirus
Humano Tipos 6, 11, 16 y 18 en Lesiones Tempranas e
Invasoras del Cervix

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O

P R E S E N T A
ROSA MARIA ORDÓÑEZ RAZO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1991



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
BIOLOGIA DEL CERVIX	3
ALTERACIONES DEL EPITELIO CERVICAL	3
EPIDEMIOLOGIA DEL CERVIX	7
PAPILOMAVIRUS HUMANO	11
MECANISMOS DE TRANSFORMACION POR PVH	14
PAPILOMAVIRUS Y CANCER CERVICAL	16
DETECCION DE PAPILOMAVIRUS HUMANO	16
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION	24
MATERIALES Y METODOS	27
MATERIAL BIOLÓGICO	27
PLASMIDOS	27
LINEA CELULAR	27
AISLAMIENTO DE ADN CELULAR	27
ELECTROFORESIS DEL ADN EN GEL AGAROSA	28
AISLAMIENTO DEL ADN PLASMIDO	29
AISLAMIENTO DEL ADN VIRAL	30
GOTEO DEL ADN DE LESIONES TEMPRANAS (DOT-BLOT)	31
TRANSFERENCIA DEL ADN DE CANCER CERVICAL A PAPEL DE NYLON (SOUTHERN-BLOT)	32
PREHIBRIDACION DEL ADN CELULAR	34
MARCAJE RADIOACTIVO DEL ADN VIRAL (SONDA)	34
HIBRIDACION DEL ADN CELULAR	35
LAVADO DEL PAPEL HIBRIDADO	35

TRAZO DENSITOMETRICO	36
RESULTADOS	37
DETECCION DE PVH EN LESIONES TEMPRANAS	37
a) Detección de PVH-6 y 11 en Lesiones Tempranas	37
b) Detección de PVH-16 y 18 en Lesiones Tempranas	47
DETECCION DE PVH EN CANCER CERVICAL AVANZADO	52
a) Detección de PVH-6 y 11 en Cáncer Cervical	52
b) Detección de PVH-16 y 18 en Cáncer Cervical	53
DISCUSION	63
DETECCION DE PVH EN LESIONES TEMPRANAS	63
DETECCION DE PVH EN CANCER CERVICAL AVANZADO	65
CONCLUSIONES	68
BIBLIOGRAFIA	69
ANEXO	81

RESUMEN

La utilización de técnicas de ingeniería genética y de biología molecular tales como, la clonación génica y la hibridación del ADN han permitido aislar e identificar diferentes tipos virales asociados a diversas enfermedades.

El cáncer cérvico-uterino (CaCu) es la enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados. Muchos estudios sugieren que un factor viral (transmitido sexualmente) está involucrado en el desarrollo del CaCu y, mencionan a algunos virus como posibles agentes infecciosos asociados a este cáncer. Consideran al Papilomavirus Humano (PVH) como el principal candidato etiológico del CaCu.

No obstante, los estudios sobre la asociación del CaCu y los PVH realizados en México, son tan pocos que no se conocen el o los tipos virales presentes en las lesiones premalignas (tempranas) e invasoras (cáncer) del cérvix en la población mexicana.

Por lo tanto, en el presente trabajo se realizó la evaluación de la presencia de papilomavirus humano tipos 6, 11, 16 y 18 en lesiones tempranas e invasoras del cérvix. Utilizando 2 técnicas de hibridación molecular (Southern-blot y Dot-blot) se detectó e identificó la presencia de PVH en ambas lesiones.

La detección de secuencias virales en las lesiones tempranas fue afectada principalmente por problemas metodológicos, puesto que, se presentaron hibridaciones cruzadas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en éstas lesiones deben ser considerados con reserva.

En CaCu no se detectaron secuencias de los tipos 6 y 11, en tanto que, los PVH 16 y 18 se encontraron en el 24.2% (17 de 70) y 10.0% (7 de 70) respectivamente. Se encontró que, los tipos virales considerados de alto riesgo (PVH-16 y 18) fueron más prevalentes en lesiones invasoras en comparación con de los de bajo riesgo (PVH-6 y 11), con lo cual se mantuvo la tendencia reportada en la literatura.

Considerando únicamente los resultados obtenidos para CaCu, la presencia de PVH se encuentra probablemente influenciada por factores intrínsecos de la población en estudio, por lo tanto, es necesario realizar la caracterización de la misma a fin de correlacionar todas las variables posibles.

INTRODUCCION

Cáncer es un término genérico que se utiliza para definir el crecimiento anormal de células con características transformantes y capacidad de invadir tejidos normales o de diseminarse a otros órganos distantes (1,2). Por lo general, este crecimiento anormal se debe a la existencia de alguna alteración en la regulación del crecimiento celular (3).

Aún se desconocen los mecanismos por los cuales se presenta, sin embargo, existe la evidencia de que la transformación de una célula normal a cancerosa es consecuencia de un daño a nivel genético, este puede ser causado por diferentes factores: a) Químicos, comprende sustancias con acción mutagénica y cancerígena: b) Físicos, como ejemplo tenemos a las radiaciones y c) Biológicos tales como los virus (4,5).

Independientemente del factor que provoque la transformación celular, se ha observado que existen alteraciones específicas en el genoma celular que provocan la proliferación masiva de un tejido que partiendo de una lesión leve puede pasar por distintas etapas intermedias hasta que finalmente adquiere la capacidad de invadir de manera agresiva, constituyendo el verdadero cáncer (6). Como ejemplo de este proceso se tiene al cérvix uterino, un órgano en el cual se han observado lesiones con distinto grado de transformación durante el desarrollo de carcinoma cérvico uterino (CaCu) (7).

BIOLOGIA DEL CERVIX.

El cérvix también llamado cuello del útero es una formación cilíndrica o cónica, de sección algo elíptica, que presenta notables variaciones de forma y tamaño (de 2.5 a 3 cm de longitud) (8). El cérvix es la parte más inferior del útero y consta de dos porciones. Una de ellas se denomina portio o exocervix que representa la parte superficial del cuello, y está en contacto directo de con la cavidad vaginal. Se encuentra revestida de un epitelio plano poliestratificado similar al de la vagina, con la que está en directa continuidad en los fórnixes o fondos de saco (8). La otra porción denominada canal cervical o endocervix y está tapizada por una mucosa rica en formaciones glandulares y se reviste por un epitelio cilíndrico mucóparo (8). Este canal es fusiforme, siendo su mayor diámetro de 5 a 8 mm. Se ha sugerido que la transformación neoplásica en el cérvix se inicia por el crecimiento progresivo de los elementos celulares inmaduros hasta ocupar todo el espesor del epitelio (9).

ALTERACIONES DEL EPITELIO CERVICAL.

El cáncer cervical histogenéticamente puede desarrollarse a través de un proceso progresivo de alteraciones que inicia en lesiones precancerosas (o tempranas) hasta el carcinoma cervical (10,11). Las lesiones tempranas de acuerdo a la clasificación clínica se agrupan en las denominadas Neoplasias Intraepiteliales Cervicales (NIC), las cuales de acuerdo al grado de agresividad de la lesión se dividen en 3 grupos: NIC I, NIC II y NIC III (12,13). Estas se identifican por cambios existentes en la superficie del epitelio, que van desde alteraciones mínimas de las células escamosas hasta la sustitución de toda su superficie por células neoplásicas así como en la intensidad de las

alteraciones nucleares (10,8).

La lesión NIC I (agrupa a las displasias leves); presenta alteraciones limitadas a la mitad interna del epitelio, pudiendo incluir o no la capa basal y representa el grado más benigno de las lesiones (10,8). Histológicamente se caracterizan por: a) Diferenciación normal o ligeramente retardada; b) Estratificación normal; y c) Trastornos en la maduración, ésta puede ser retardada a nivel de citoplasma o anormal a nivel nuclear. Los núcleos son ligeramente irregulares, aumentados de tamaño, cromatina gruesa y ligera hiper cromasia (10,8).

La lesión NIC II ó displasia moderada a diferencia de la anterior presenta una mayor vitalidad de los núcleos y mayor actividad proliferativa; expresan un aumento significativo de la actividad mitótica y estados hiperpiásicos más o menos acentuados. El trastorno se limita en general a la mitad interna del epitelio y se caracteriza por: a) Diferenciación retardada, no destacándose la formación de puentes intercelulares en zona displásica. b) Estratificación bastante conservada; y c) Trastornos de la maduración más acentuados que en la displasia leve, ya que las células presentan características de inmadurez y aspecto en empalizada, anomalías nucleares marcadas y presencia de mitosis atípicas (10,8).

Las NIC III (displasias severas o graves y los carcinomas *in situ*); presentan alteraciones que afectan ya casi todo el espesor del epitelio y las imágenes de atipia celular y epitelial son muy patentes. Las características histológicas de las displasias severas son: a) Diferenciación epidermoide muy tardía o ausente. b) Estratificación tardía o ausente; y c) Trastornos de la maduración muy evidentes, tales como células ovaladas o incluso fusiformes, con citoplasma escaso alrededor del núcleo y frecuentes mitosis,

generalmente en la mitad del epitelio, muchas veces anormales (10,8).

En el carcinoma *in situ* las alteraciones no rebasan la membrana basal; histológicamente, hay pérdida de la arquitectura normal del epitelio y marcadas anomalías celulares, pérdida de la polaridad y mitosis atípicas (10,8). El límite entre el epitelio normal y el carcinoma *in situ* puede ser brusco o progresivo, con zonas de transición entre el epitelio normal, alteraciones displásicas y el carcinoma *in situ* (10,8).

Por otro lado, existen lesiones del cérvix que no son consideradas NIC y que algunos autores señalan como la primera etapa en el proceso neoplásico, estas lesiones son los llamados Condilomas (14). Meisels y Fortin han insistido en la importancia de los condilomas (específicamente los condilomas planos) en la génesis del carcinoma cervical (15).

Colposcópicamente los condilomas son manchas blancas con fino punteado vascular (10,16), e histológicamente se presentan alteraciones acantósicas más o menos acentuadas y disqueratosis superficial, que en ocasiones pueden verse como lesiones endofíticas (10,16).

En el Carcinoma Cervical, las lesiones ya rebasan la membrana basal así como el estroma, alcanzando a los vasos linfáticos y sanguíneos que son los puntos de partida de las propagaciones a distancia (8, 17). Se presentan nidos o cordones de células atípicas que infiltran el estroma subyacente de forma irregular y anárquica, así como las características morfológicas de las células atípicas que determinan el grado de diferenciación del carcinoma. Histológicamente se clasifica el grado del carcinoma cervico uterino de acuerdo a la semejanza entre las capas celulares presentes en este cáncer y las capas del epitelio pavimentoso normal (8,17); así como por la presencia de espinas intercelulares, que denuncian el origen maipighiano del carcinoma (8,17). Ashley sugiere la existencia de dos formas de carcinomas:

carcinoma (8,17). Ashley sugiere la existencia de dos formas de carcinomas: unos de evolución lenta y progresiva (pasan por las fases de displasia o carcinoma *in situ*) y los de progresión precoz y rápida, que se convierten directamente en carcinoma invasor.(18).

Tanto los condilomas como los NIC (en sus diferentes grupos) pueden ser reversibles. Sin embargo, comparando el grado de reversión de las lesiones, los condilomas tienen mayor probabilidad de reversión que los NIC (12, 19). Figura 1.

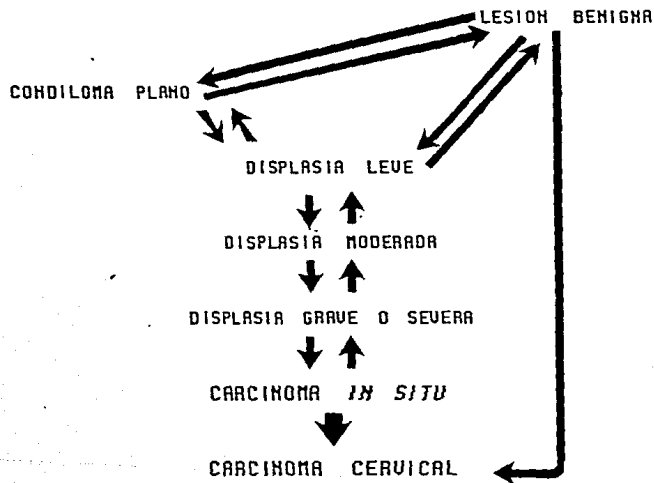


FIGURA 1. Histogénesis del carcinoma cérvico uterino

EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER CERVICAL.

Los estudios epidemiológicos realizados en cáncer cervical han mostrado que es un cáncer bastante frecuente, el cual ocupa en muchos países de América Latina el primer lugar de incidencia dentro de las neoplasias presentes en la mujer (20,21). En México, de acuerdo a los datos del Registro Nacional de Cáncer para el período 1983-84 (Cuadro 1), el cáncer de cérvix ocupa el primer lugar de incidencia con un total de 6966 casos (21.4%) seguido por el cáncer de mama con 3712 casos (11.4%) (21), en tanto que, para la población del Instituto Nacional de Cancerología la incidencia de cáncer cervical para 1983 fue de 494 casos (43.4%) (21) Cuadro 2.

La edad promedio de aparición de lesiones cervicales varía según la población, pero de manera general el promedio de edad de pacientes con NIC es menor que para el carcinoma *in situ* y a su vez el de ambos es menor que el promedio de edad de pacientes con carcinoma cervical (22). Por ejemplo, McKay y cols. señalan como promedio de edad para NIC I 28.5 años, para NIC II y III un promedio de 34.5 años y para cáncer cervical 40 años (23). Otros autores reportan que para lesiones condilomatosas el rango de edad varía entre los 20 y 30 años, en mujeres mayores de 40 años sólo se encuentra en un 12% y para mujeres mayores de 50 años se encuentra en un 3% (24). Carmichael y cols. así como Doll reportan que la incidencia de cáncer cervical se ha incrementado en las mujeres jóvenes, lo cual atribuyen a cambios en los hábitos sexuales de las nuevas generaciones (25,25).

En la actualidad se han identificado diferentes factores de riesgo en el desarrollo del Cáncer Cérvico Uterino (CaCu). Diferentes grupos señalan que, tanto en las NIC como en el carcinoma cervical las variables

CUADRO 1. FRECUENCIA DE CANCER DE ACUERDO A SU LOCALIZACION.

CANCER	CASOS	%
1) CERVIX	6966	21.4
2) MAMA	3712	11.4
3) LEUCEMIAS Y LINFOMAS	3136	9.6
4) PROSTATA	1343	4.1
5) ESTOMAGO	1235	3.7
6) PULMON	1219	3.7
7) OVARIO	956	2.9
8) VEJIGA URINARIA	827	2.5
9) TEJIDO CONJUNTIVO	809	2.4
10) ENCEFALO	796	2.4
11) UTERO	794	2.4
12) TIROIDES	735	2.2
13) TESTICULO	641	1.9
14) PIEL (MELANOMA)	597	1.8
15) RIÑON URETER	571	1.7
16) COLON	568	1.7
17) HUESOS Y ARTICULACIONES	555	1.7
18) LARINGE	509	1.5
19) BOCA	507	1.5
20) RECTO ANO	504	1.5
21) VESICULA Y VIAS BILIARES	465	1.4
22) PANCREAS	300	0.9
23) HIGADO	290	0.9
24) VULVA Y VAGINA	289	0.9
25) PERITONEO-RETROPERITONEO	262	0.8
26) ESOFAGO	247	0.7
27) OJO	225	0.6
28) FARINGE	221	0.6
29) MIELOMA MULTIPLE	217	0.6
30) FOSAS Y SENOS NAALES, OIDO	202	0.6
31) LENGUA	185	0.5
32) NERVIOS PERIFERICOS	129	0.4
33) PLEURA	110	0.3
34) PENE	105	0.3
35) INTESTINO DELGADO	31	0.2
36) DESCONOCIDA O NO PRECISADA	<u>2255</u>	6.8
TOTAL	32465	

BARROSO, 1986.

socioeconómicas, la conducta sexual, los agentes infecciosos transmitidos sexualmente, el tipo de dieta, la historia reproductiva y el uso de anticonceptivos hormonales, representan los principales factores de riesgo (27,28).

CUADRO 2. CASOS DE CANCER EN LA MUJER ATENDIDOS EN EL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA DURANTE 1983-84

CANCER	CASOS	%
CERVIX	494	43.4
MAMA	235	20.7
OTROS	<u>409</u>	<u>35.9</u>
TOTAL	1138	100.0

BARROSO, 1986.

ACTIVIDAD SEXUAL: Desde 1842 Rigoni-Stern reconocieron la importancia de la actividad sexual como un factor de riesgo de cáncer cervical (29). A la fecha hay muchos estudios que revelan el riesgo directo de desarrollar carcinoma cervical con el aumento de compañeros sexuales, debido a que aquellas mujeres que tienen más de un compañero sexual presentan una mayor frecuencia de desarrollo del cáncer cervical (30). Por otra parte, se considera como grupo de alto riesgo aquellas mujeres que inician la vida sexual a temprana edad. Por ejemplo, Rotkin ha demostrado claramente que el factor epidemiológico más importante de lesiones preinvasoras y carcinoma cervical es la edad del primer contacto sexual (31).

FACTORES NUTRICIONALES: Existe evidencia de que la deficiencia de ciertos nutrientes esta asociada al desarrollo de lesiones cervicales, tal es

actuar como protectores contra cáncer de células escamosas (32). Wylie-Rosset y cols. han mostrado que mujeres con una dieta baja en vitamina A y β -caroteno presentan más frecuentemente NIC III ó carcinoma *in situ* en comparación con aquellas con alta ingestión de éstos nutrientes (33).

USO DE ANTICONCEPTIVOS: Algunos estudios han mencionado la asociación entre el cáncer cervical y el uso de anticonceptivos (34,35,36). Sin embargo, esta asociación no es contundente, debido a que existen reportes en los cuales no se encuentra relación alguna entre estas dos variables (37). De acuerdo a Cramer el uso de anticonceptivos puede incrementar el riesgo a desarrollar cáncer cervical (22).

AGENTES INFECCIOSOS: En base a numerosos estudios epidemiológicos y moleculares se ha observado que, posibles factores etiológicos, aunados a factores predisponentes (factores de riesgo) pueden favorecer el desarrollo de lesiones cervicales premalignas a lesiones malignas (38). Inicialmente, se asociaron diferentes agentes infecciosos a la carcinogénesis cervical, tales como, el *Treponema pallidum* que en un tiempo fué considerado como factor de riesgo en el desarrollo del carcinoma cervical, pero esta idea se ha desechado debido a que actualmente sólo del 1.1 al 3.9% de los carcinomas cervicales tienen pruebas serológicas positivas para sífilis (39,40).

De manera similar sucedió con un protozoo flagelado *Trichomonas vaginalis*, el cual se asoció a procesos displásicos e inflamatorios, sin embargo, los datos no son suficientes para apoyar algún posible papel etiológico de ésta con el CaCu (39,40).

Posteriormente, se ha asociaron algunos agentes virales tales como el Virus del Herpes Simple tipos 2 (VSH-2), y más recientemente el

Papilomavirus Humano (PVH) (42,43). La primera evidencia sobre la posible asociación de VHS-2 con cáncer cervical fué reportada por Naib y colaboradores en 1966 (44), al encontrar que de 673 pacientes con herpes genital, 11 presentaron además cáncer cervical invasor; otros 25 presentaron carcinoma *in situ* y 69 con displasia. Sin embargo, actualmente este número se ha reducido; encontrando que la incidencia de PVH esta por encima de la de VHS-2 (45).

La primeras demostraciones de que los papilomavirus eran capaces de inducir la transformación celular fueron dadas por Shope y Hurst en 1933 quienes aislaron y caracterizaron papilomavirus en conejos cola de algodón, y observaron la capacidad de éste virus para inducir transformación en células infectadas (46, 47). Actualmente muchos autores mencionan al PVH como el posible agente causal del desarrollo neoplásico (48,49).

PAPILOMAVIRUS HUMANO.

El *Papilomavirus* es miembro de la familia *Papoviridae* y se distingue porque al observarse en el microscopio electrónico, la partícula viral presenta una forma icosaédrica de aproximadamente 45-55 nm de diámetro; la cual contiene sólo ADN y proteínas (50, 51). El genoma esta conformado por una doble cadena de ADN circular de 7900 pares de bases (pb) aproximadamente. La organización genética es muy similar en casi todos los tipos diferentes de papilomavirus (tanto de humanos como de animales) (51). Presentan una estructura básica muy similar, con homología de secuencia moderada (45%) o alta (85%) (52,53). La estructura de los PVH se puede observar en el mapa genético mostrado en la figura 2. Sin embargo presentan diferencias en cuanto a sitios de corte con diferentes enzimas, por ejemplo la

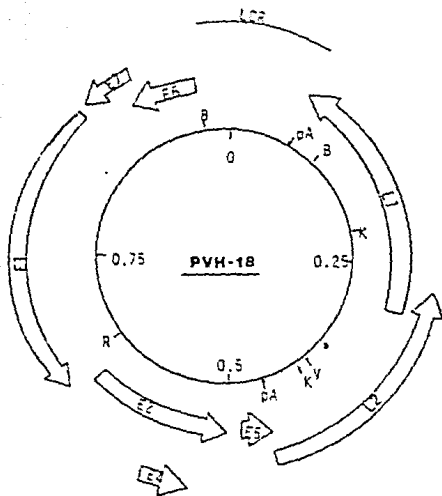


Figura 2. Mapa Genético del Papilomavirus Humano 18 (PVH-18). Los PVH presentan marcos de lectura abiertos organizados en regiones de expresión temprana que codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2) y transformación celular (E6 y E7) y, regiones de expresión tardías (L1 y L2) que codifican para proteínas de la cápsida. LCR es la región larga de control; pA es la señal de poliadenilación. Se muestran los sitios de corte para las enzimas Bam-HI (B), Eco-R1 (R), KpnI (K) y EcoRV (V).

cuadro 3 muestra los patrones de bandas de los tipos 6, 11, 16 y 18 obtenidos al cortarse con la enzima Pst-I.

CUADRO 3. PATRON DE BANDAS DE DIFERENTES PVH AL CORTARSE CON ENZIMA Pst-I. (PESOS MOLECULARES EN DALTONS X 10⁻⁶).

PVH 6	PVH 11	PVH 16	PVH 18
3.45	1.12	2.9	3.8
0.92	0.98	1.9	2.8
0.53	0.95	1.6	0.54
	0.60	0.9	0.40
	0.50		
	0.50		
	0.30		

Los PVH presentan marcos de lectura abierta (ORF), organizados en regiones de expresión temprana (E) y tardía (L). Las regiones tempranas codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2), y transformación celular (E6 y E7) (Figura 2). Las tardías codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2). El genoma contiene una región larga de control (LCR) de aproximadamente 1 Kilobase (kb), el cual no tiene ningún ORF y sólo se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de la replicación. La información codificada se encuentra localizada en una de las cadenas de ADN y los marcos de lectura tienen la misma orientación transcripcional, con sobreposición de algunos de ellos (54).

Se ha observado que PVH infecta células epiteliales (células basales) de la piel y de superficies mucosas, en donde el virus puede permanecer en forma latente (54,55). De tal manera que, a medida que se diferencian las células, el ADN viral se replica, se transcribe y forma viriones completos; lo que sugiere que durante los diferentes estadios de la diferenciación de los epitelios algunos factores celulares participan en la regulación del ciclo viral (54). Cuando el PVH infecta las mucosas genitales induce la diferenciación de koilocitos (los Koilocitos son las células características de la infección de PVH), en algunos de los cuales aparecen antígenos virales de la cápside (55).

La especificidad de los PVH por tejido epitelial puede estar determinada por elementos de la región larga de control (LCR), debido a que se han caracterizado en esta región fragmentos cortos de ADN capaces de conferir especificidad tisular (54,56). Los tipos 6,11, 16 y 18 por ejemplo, presentan una región con estas características (57,58,59).

El resultado más frecuente de la infección con PVH es la proliferación de células epiteliales (60), la cual puede persistir o puede revertirse espontáneamente. Con el estudio de los PVH se encuentra que en los papilomas existen una serie de modificaciones tanto en las membranas de células epiteliales como en las proteínas citoplasmáticas (60).

MECANISMOS DE TRANSFORMACION POR PVH.

Muchos estudios realizados con cáncer cervical y PVH, han dado la pauta para suponer un posible efecto causal de PVH en el desarrollo del cáncer cervical (61). Sin embargo, el mecanismo por el cual el virus transforma a la célula aún no está bien establecido (62), pero se sabe que los PVH 6, 11, 16 y 18 se pueden encontrar tanto en estado episomal como

integrados al ADN en lesiones precancerosas y benignas (63,64). En células cancerosas se encuentran los PVH 16 y 18 en forma no productiva e integrados al genoma celular, de forma general están amplificados en unas 50-200 copias por célula (63,64), esto parece indicar que la integración de los PVH 16 y 18 se encuentra relacionada con el proceso de malignización de las células normales o con la progresión tumoral (63,64).

Los sitios de inserción del ADN viral en el ADN celular al parecer son variados y no hay un sitio único, el ADN viral por lo regular se abre en la región E1-E2 durante la inserción al ADN celular. Es posible que la inserción de secuencias virales cerca de algún proto-oncogén celular pueda activar a estos últimos a favorecer el desarrollo de transformación maligna (65, 66), como pueda observarse en algunas líneas celulares derivadas de carcinomas cervicales donde el ADN viral se encuentra insertado cerca de los oncogenes c-myc, c-ras y c-src (67). Gariglio y cols. han encontrado en muestras de carcinoma cervical secuencias de PVH-16 muy cerca, o dentro, del oncogén c-myc ; lo que origina alteraciones en este gen (rearrangios) (67, 68).

Por otro lado, se considera que las regiones E6 y E7 forman parte de algún mecanismo de transformación y a su vez son importantes para la conservación del fenotipo maligno (69).

Algunos estudios, han mostrado la existencia , en células normales, de algún mecanismo de control negativo para genes tempranos de PVH regulado por un factor humoral (70). Consecuentemente, la transformación pueda deberse a una falla en los mecanismos celulares que regulan la expresión de los genes virales persistentes (71). Esto sugiere que además de la infección viral se requiere que otros agentes lesionen el ADN celular, para que se favorezca el desarrollo del cáncer (71). Por lo tanto, con esto se

podrían explicar los grandes períodos de latencia entre la infección primaria de PVH y el desarrollo del tumor (71).

PAPILOMAVIRUS Y CANCER CERVICAL.

A partir de las primeras evidencias del potencial transformante de los PVH y de su posible asociación con el proceso neoplásico, se iniciaron una serie de estudios en diferentes tipos de cáncer; y se observó la existencia de afinidad específica entre los diferentes tipos de PVH con lesiones específicas, Cuadro 4.

Hasta el momento se tienen caracterizados 60 tipos diferentes de PVH, de los cuales 22 se asocian principalmente a lesiones del tracto genital (72). En particular, los tipos 6, 11 (73,74) a lesiones premalignas y los PVH 16, 18, 31, 33, 35, 52b al carcinoma cervical (75,76,77,78,79,80).

Los PVH 6 y 11 se han encontrado en 90-100% de las lesiones benignas, en 25% de lesiones precancerosas y muy raramente en lesiones cancerosas (2%) (54). En tanto que, en carcinomas cervicales (CaCu) los PVH 16 y 18 se encuentran en el 50-90% de los casos. De manera general se observa que en CaCu el PVH-16 es más frecuente que el PVH-18 (en una proporción de 3:1) (54).

DETECCION DE PAPILOMAVIRUS HUMANO.

Existen diversos métodos de detección de PVH, los cuales se pueden agrupar en: morfológicos, químicos y moleculares.

MORFOLOGICOS: son aquellos que se basan en la identificación morfológica de células que presentan características de infección (15). Las características citológicas e histológicas se encuentran bien definidas; por lo que la detección por este método es confiable (15). sin embargo, la dificultad

CUADRO 4. ASOCIACION DE LOS TIPOS DE PAPILOMAVIRUS HUMANO CON DIFERENTES LESIONES BENIGNAS Y MALIGNAS.

PVH	LESION	REFERENCIAS
1	VERRUGAS PLANTARES	FAVRE et al. (1975)
2	VERRUGAS COMUNES	ORTH et al. (1977)
3	VERRUGAS PLANAS	ORTH et al. (1978)
4	VERRUGA COMUN DE PLANTA DEL PIE	GISSMANN et al. (1977)
5*	LESIONES MACULARES/CARCINOMA	ORTH et al. (1980)
6	CONDILOMA ACUMINADO	GISSMAN AND ZUR HAUSEN (1980).
7	VERRUGAS COMUNES	ORTH et al. (1981)
8*	LESIONES MACULARES/CARCINOMA	ORTH et al. (1980)
9*	LESIONES MACULARES	ORTH et al. (1980)
10*	VERRUGAS PLANAS/ INTERMEDIAS	ORTH et al. (1980)
11	CONDILOMA ACUMINADO	GISSMANN et al. (1982)
12*	LESIONES MACULARES	ORTH et al. (1980)
13	HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL	PFISTER et al. (1980)
14*	LESIONES MACULARES	TSUMORI et al. (1983)
15* - 17*	LESIONES MACULARES	KREMSDORF et al. (1984)
18	DISPLASIA/CARCINOMA	DURST et al. (1983)
19	DISPLASIA/CARCINOMA	BOSHART et al. (1984)
19* - 24*	LESIONES MACULARES	KREMSDORF et al. (1984)
25*	LESIONES MACULARES	GASSENMAIER et al. (1984)
26	VERRUGAS INTERMEDIAS	OSTROW et al. (1984)
27	VERRUGAS PLANAS	OSTROW et al. (1986)
28*	VERRUGAS INTERMEDIAS	ORTH AND FAVRE (1985)
29	VERRUGAS COMUNES	M. FAVRE AND ORTH (COMUNICACION PERSONAL)
30	CONDILOMA/CARCINOMA	KAHN et al. (1988)
31	DISPLASIA	LORNOD et al. (1988)
32	HIPERPLASIA EPITELIAL FOCAL	BEAUDENON et al. (1987)

* ASOCIADO CON EPIDERMODISPLASIA VERRUCIFORME
TOMADO DE GALLOWAY AND McDOUGALL (1989).

CUADRO 4. ASOCIACION DE LOS TIPOS DE PAPILOMAVIRUS HUMANO CON DIFERENTES LESIONES BENIGNAS Y MALIGNAS (CONTINUACION)

PVH	LESION	REFERENCIAS
33	NICOCARCINOMA	BEAUDENON et. al. (1965)
34	PAPULOSIS DE BOWENOID	KAWASHIMA et. al. (1965)
35	NIC	LORINCZ et. al. (1965)
36*	KERATOSIS ACTINICA	KAWASHIMA et. al. (1965)
37	KERATOCANTOMA	SCHLEUREN et. al. (1965)
38	MELANOMA MALIGNO	SCHLEUREN et. al. (1965)
39	PAPULOSIS DE BOWENOID	BEAUDENON et. al. (1967)
40	CARCINOMA LARINGEO	KAHN et. al. (1965)
41	CONDILOMA VERRUGAS PLANAS	GRIMMEL et. al. (1965)
42	PAPULOSIS DE BOWENOID	BEAUDENON et. al. (1967)
43	DISPLASIA	LORINCZ et. al. (1965)
44	CONDILOMA DISPLASIA	LORINCZ et. al. (1965)
45	CONDILOMA	NAGHASHFAR et. al. (1967)
46	LESIONES MACULARES	GROSS et. al. (1965)
47*	LESIONES MACULARES	ADACHI et. al. (1965)
48	CARCINOMA DE PIEL	GALLAHAN et. al. (1966)
49	VERRUGAS INTERMEDIAS	M. FAVRE AND G. ORTH (COMUNICACION PERSONAL)
50*	KERATOSIS ACTINICA	M. FAVRE AND G. ORTH (COMUNICACION PERSONAL)
51	CONDILOMA	NOUYO et. al. (1965)
52b	CARCINOMA CERVICAL	SHIMODA et. al. (1965)
53	?	GALLAHAN et. al. (1966)
54	TUMOR DE BUSCHKE-LOWENSTEIN	KREMSDORF AND G. ORTH (COMUNICACION PERSONAL)
55	CONDILOMA	M. FAVRE AND G. ORTH (COMUNICACION PERSONAL)

* ASOCIADO CON EPIDERMODISPLASIA VERRUCIFORME

TOMADO DE GALLOWAY AND McDOUGALL (1965).

en el reconocimiento sigue representando un problema, debido a que, por una parte los condilomas presentan tanto características de displasias como de carcinomas y por otra a que el criterio varía de observador a observador. Además, através de éstos métodos no es posible conocer el tipo viral específico que esta infectando a la célula (81).

QUÍMICOS: La detección se basa en técnicas de inmunohistoquímica, en donde el complejo antígeno-anticuerpo se marca de tal manera que sea posible detectar el antígeno relacionado con las proteínas de la cápside del virus mediante microscopía de luz. Sin embargo, se presenta el problema de que cuando coexisten NIC y condiloma la positividad hacia PVH es menor que cuando se trata únicamente de condiloma (81,82), lo que provoca que la confiabilidad del diagnóstico sea menor.

MOLECULARES: Con este tipo de detección es posible identificar partículas virales o proteínas de cápside así como el ADN y ARN del virus tanto en infecciones productivas como en áreas de transformación neoplásica (83). A su vez permite identificar el tipo viral específico que se encuentra infectando al tejido (84,85).

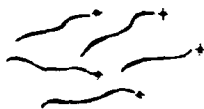
En la detección molecular se utiliza la hibridación, ésta se define como la formación específica de una cadena doble de ADN o ARN a partir de dos cadenas sencillas, cada una obtenida de distinta fuente (84). Para el caso específico de PVH, la detección se realiza mediante apareamiento entre el ADN viral clonado en un plásmido (el cual es marcado con un isótopo radioactivo) y el ADN viral que se encuentra en el genoma celular del tejido cervical (84). Figura 3.

Existen diferentes métodos o técnicas de hibridación, como: Southern-blot, Dot-blot, Northern-blot, Hibridación *in situ*, y el método de

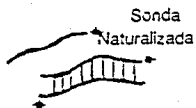
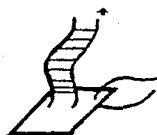
ADN
blanco



Sonda de ADN desnaturalizada
y marcada radioactivamente



HIBRIDACION



LAVADOS



Figura 3. Hibridación de ADN en papel de nylon. El ADN sonda es desnaturalizado y marcado radioactivamente, posteriormente se coloca el ADN blanco en contacto con el ADN sonda para realizar la hibridación de las secuencias homólogas. El papel se lava para eliminar hibridaciones inespecíficas, permaneciendo las hibridaciones más específicas.

amplificación del ADN por reacción en cadena de polimerasa (PCR) (85).

a) Southern-blot: Este método se basa en el análisis de ADN (cortado con enzimas de restricción específicas para cada tipo viral) mediante electroforesis en geles de agarosa y su posterior transferencia a papel, el cual puede ser de nitrocelulosa o de nylon (84,85). Mediante este método es posible conocer el tipo viral específico, debido al patrón de bandas específico que se obtiene para cada tipo viral (84,85). La realización de electroforesis es indicativo de una purificación extra del material (85). Se trata de un método bastante sensible (Cuadro 5), ya que pueden utilizarse de 0.1 a 1.0 copias de genoma viral por célula; además de que puede proporcionar información sobre el estado de las secuencias de ADN (si el virus se encuentra integrado o episomal) (85).

b) Northern-blot: Este método se utiliza para analizar ARN y es análogo al southern-blot. Sin embargo, el northern no utiliza corte con enzimas de restricción, debido a que el ARN se degrada fácilmente por lo que no es necesario cortarlo (84).

c) Dot-blot: Es un método rápido para analizar ADN o ARN, en el cual se omite el uso de enzimas de restricción y de electroforesis. El ADN o ARN obtenido se gotea directamente sobre el papel de nitrocelulosa o nylon. En este método es difícil distinguir entre subtipos virales, debido a que se pueden tener con mayor facilidad hibridaciones cruzadas entre los diferentes tipos de PVH (dependiendo del grado de homología entre ellos) así como entre los subtipos de los PVH (84,85). Sin embargo, si se utilizan los controles adecuados y condiciones de alta estrictancia ($T_m - 25^{\circ}\text{C}$) durante la hibridación seguida por lavados a una $T_m - 10^{\circ}\text{C}$, se minimiza la hibridación cruzada y la prueba puede ser bastante confiable (84). En cuanto

CUADRO 5 COMPARACION ENTRE LOS DIFERENTES METODOS DE HIBRIDACION MOLECULAR UTILIZADOS PARA DETECCION DE PVH.

METODO	NIVEL DE SENSIBILIDAD	CARACTERISTICAS
SOUTHERN-BLOT	EN PROMEDIO REQUIERE DE 0.1-1.0 GENOMAS VIRALES/CELULA. PARA SU ANALISIS SE REQUIEREN 10^6 CELULAS	PUEDA DETECTAR TIPOS VIRALES ESPECIFICOS Y ANALIZAR SI ESTAN INTEGRADOS. REQUIERE ESPECIMENES FRESCOS.
DOT-BLOT	COMPARABLE CON SOUTHERN-BLOT	DIFFICIL DETECCION DE REACCIONES POSITIVAS DEBILES.
HIBRIDACION <i>in situ</i> EN PAPEL	NECESITA CELULAS QUE CONTENGAN MINIMO 10^4 GENOMAS VIRALES	BAJA SENSIBILIDAD Y LOS RESULTADOS SON NO INTERPRETABLES PARA UN NUMERO SIGNIFICATIVO DE MUESTRAS. REQUIERE DE ESPECIMENES FRESCOS.
HIBRIDACION <i>in situ</i> DE TEJIDO	REQUIERE CELULAS QUE CONTENGAN MAS DE 20-50 GENOMAS VIRALES	BAJA SENSIBILIDAD; TRABAJO INTENSO. SE PUEDE UTILIZAR TEJIDO FRESCO O FIJADO.
AMPLIFICACION DEL DNA POR REACCION EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)	MAS SENSIBLE QUE SOUTHERN-BLOT; PUEDE DETECTAR HASTA UNA COPIA DEL GENOMA VIRAL.	ALTA ESPECIFICIDAD, AUTOMATIZADA Y PUEDE UTILIZAR ESPECIMENES FRESCOS O FIJADOS

LANCASTER Y NORRILD (1982).

a sensibilidad es comparable con el southern-biot (Cuadro 5).

d) Hibridación *in situ*: En este método se utiliza material histológico tratado y colocado especialmente en portaobjetos; usando los ácidos nucleicos como células blanco. Este método permite utilizar especímenes frescos o fijados en parafina, sin embargo, tiene la desventaja de que se requieren entre 20 a 50 copias del genoma viral para ser detectado, por lo tanto la sensibilidad es baja (84,85). Cuadro 5.

e) PCR: Este método utiliza oligonucleótidos y DNA polimerasa para amplificar el ADN y realizar la detección de secuencias virales tanto en células normales como transformadas. Este método se puede realizar utilizando sólo un pequeño segmento de ADN viral, el cual es amplificado y posteriormente detectado por hibridación estandar. De acuerdo con las características de este método se considera el más sensible, ya que en teoría el límite de detección sería de una copia del genoma viral, es decir, es posible detectar hasta una sola copia viral (85). Cuadro 5.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

Las primeras evidencias de asociación entre Papilomavirus Humano (PVH) y lesiones genitales fueron dadas por Ciuffo en 1907 (66), quien detectó la presencia de este virus en verrugas genitales. A partir de ese momento se iniciaron estudios tendientes a observar qué papel jugaban los PVH en la carcinogénesis cervical.

Los primeros estudios sobre prevalencia de PVH en lesiones cervicales dieron la pauta para que algunos autores pensaran en los PVH como posible agente etiológico del cáncer cervical. En los años 70's la hipótesis de que la infección por PVH podría ser la causante del cáncer cervical fue publicada (72), en 1976 se realizó la descripción de la heterogeneidad genética (tipos y subtipos) de los PVH (87).

Los estudios continuaron y en 1980, Gissmann y zur Hausen (60,72) aislaron y caracterizaron el primer PVH genital, se trató entonces del PVH-6 (73). Posteriormente, al analizar lesiones premalignas del cérvix encontraron secuencias tanto de PVH-6 como de otro tipo, al cual denominaron PVH-11 (74). En base a éstos y otros estudios posteriores se consideró que existía cierta asociación tanto del PVH-6 como del PVH-11 a lesiones precancerosas (73,74,88).

Estudios similares en cáncer cérvico-uterino (CaCu) asociaron los PVH-16, PVH-18, PVH-31, PVH-33 y PVH-35 a este cáncer (75,76,77,78,79).

Actualmente, los PVH se continúan estudiando y nuevos tipos se han aislado y caracterizado. Hasta el momento se encuentran reportados 60 tipos

distintos, de los cuales 22 están relacionados con lesiones genitales (72).

De manera que, además de los PVH-6 y PVH-11 asociados a lesiones tempranas se agregan ahora los tipos 43, 44 y 45 (89). En tanto que, para carcinoma cervical se ha asociado más recientemente el PVH-52b (89).

En México, el cáncer cérvico-uterino es la neoplasia más frecuente y se presenta en el 21.4% de los casos (21). Debido a su alta frecuencia es un cáncer bastante estudiado, sin embargo, poco es lo que se ha logrado en su detección y prevención temprana.

Estudios realizados en otros países muestran que, se encuentran secuencias de PVH-6 y PVH-11 en el 25% de las lesiones precancerosas y muy raramente (aproximadamente el 2%) en lesiones cancerosas (90,91). A su vez, el 50-90% de los casos de cáncer cervical avanzado, presentan secuencias de los tipos 16 y 18 (54).

Otros estudios indican que la infección por PVH puede estar influenciada por algunos factores intrínsecos de la región o población estudiada (92,95), estos factores podrían de alguna manera actuar en conjunto con la infección viral por lo que la detección de PVH en lesiones cervicales varía (92,95), sin embargo, esta influencia no es del todo clara. Se ha mencionado a la zona geográfica como uno de estos factores (92), lo que explicaría la variación en la detección de PVH en las distintas poblaciones (92,95). En promedio el PVH-16 se encuentra en el 60% de los casos de Europa y Sudamérica y en el 40% en EUA y África, lo que refleja una verdadera heterogeneidad geográfica (75).

Pocos son los estudios enfocados al análisis molecular de PVH en lesiones cervicales realizados en la población mexicana. Gariglio y cols. (66) realizaron el análisis de ADN obtenido de 16 biopsias de cáncer avanzado y

utilizando la técnica de hibridación southern-blot encontraron la secuencias de PVH-16 en el 31% (5 de 16) de las muestras. Un estudio comparativo entre la población de Monterrey y la población de la Cd. de México reporta que la prevalencia de secuencias de PVH-16 es similar en ambas poblaciones. Además, el 7% de los tumores presentaron secuencias de PVH-18 y en el 25% detectaron otros subtipos virales (93).

Recientemente, un estudio epidemiológico en donde se evaluó la asociación de PVH tipo 16 y 18 en 759 casos de cáncer cervical invasor en América Latina, mediante la técnica de hibridación *in situ*; reporta secuencias de PVH-16/18 en 82% de los casos (94).

Los estudios realizados en México, se basan primordialmente en el análisis de cáncer cervical avanzado. Sin embargo, se requieren estudios de detección de secuencias de PVH en lesiones tempranas; debido a que, si de alguna manera los PVH tienen importancia etiológica en el cáncer cérvico uterino se hace necesario conocer si el virus se encuentra presente en las etapas iniciales de este cáncer.

Finalmente, debido a que no existen reportes en los cuales se estudie la asociación de PVH con lesiones tempranas en la población mexicana y a que son pocos los estudios realizados en cáncer cervical; en este trabajo se pretende evaluar la presencia de secuencias de ADN de PVH tipos 6, 11, 16 y 18 en el ADN celular obtenido de tejido tanto de lesiones tempranas como de cáncer cervical avanzado.

MATERIALES Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO.

En el estudio se incluyeron pacientes vírgenes de tratamiento atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología. Se obtuvieron 20 biopsias de tejido histológicamente normal, 26 condilomas, 40 biopsias de lesiones tempranas del cérvix, obtenidas por colposcopia y 70 biopsias de carcinoma cervical avanzado.

PLASMIDOS:

Se utilizaron plásmidos que contienen las secuencias de ADN de los Papilomavirus Humano (PVH) tipos 6,11, 16 y 18 ; los cuales fueron proporcionados por los Drs. E.M. de Villiers, H. Zur Hausen y L. Gissman del Instituto de Virología de Heidelberg, República Federal Alemana.

El ADN complementario (ADNc) del gene β -Tubulina humano fue proporcionado por el Dr. Larry Kedes de la Universidad de Stranford, California; Estados Unidos de Norteamérica.

LINEA CELULAR:

El ADN de la línea celular HeLa se utilizó como control positivo y fue proporcionada por el Dr. Carlos Fernandez Tomas del Departamento de genética y Biología Molecular del CINVESTAV, Instituto Politécnico Nacional.

AISLAMIENTO DEL ADN CELULAR.

Las muestras de tejido se disgregaron y se digirieron adicionando amortiguador de lisis (Tris-HCl 20mM , acetato de sodio 0.3 M y EDTA 1mM; pH 7.5), proteinasa K (10 mg/ml) y dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.5%, e

incubando a 37 °C toda la noche. Posteriormente, la mezcla se procesó mediante extracción con solventes orgánicos, agregando un volumen de fenol-saturado con TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM). La mezcla se centrifugó a 2500-3000 rpm (GLC-2, rotor HL-4) durante 5 minutos. La fase acuosa se mezcló con un volumen de fenol saturado:cloroformo (en una proporción 24:1) repitiendo la centrifugación. Finalmente la fase acuosa se mezcló un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico centrifugando en las mismas condiciones. El ADN se precipitó adicionando a la fase acuosa 2 volúmenes de etanol al 100%, dejando precipitar durante 2 horas a -70°C. El ADN precipitado se empastilló por centrifugación a 12000 rpm (RC5B, rotor SS34) durante 20 minutos y la pastilla se resuspendió en agua bidestilada. Finalmente, la cantidad de ADN se cuantificó a una longitud de onda de 260 y 280 nm en el espectrofotómetro.

Los linfocitos fueron obtenidos mediante la técnica de ficoll-hypaque, de una muestra de 10 ml de sangre de pacientes. Posteriormente, de ellos se extrajo el ADN que se utilizó como control.

ELECTROFORESIS DEL ADN EN GEL DE AGAROSA.

El ADN celular se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Los geles se prepararon disolviendo 1g de agarosa y 100 µl de bromuro de etidio (1 µl/ml) en 100 ml de TBE 1X (TBE10X=Tris-base 0.5 M, Acido Bórico 0.5 M y EDTA disódico 0.025 M). Posteriormente, se virió la mezcla en la cámara de electroforesis en donde una vez que gelificó la agarosa se adicionó el amortiguador de corrida TBE 0.5X. El ADN se mezcló con amortiguador de muestra (azul de bromofenol 0.025M y xilenol 0.025 M) se colocó en los pozos del gel y se sometió a 60 volts hasta que el colorante llegó al frente del gel. Finalmente el gel se observó en un

transiluminador de luz ultravioleta.

El ADN de las muestras analizadas de esta forma se almacenó a -20°C hasta su utilización en los ensayos de hibridación.

AISLAMIENTO DEL ADN PLASMIDO .

Los plásmidos que portan el ADN de los Papiloma Virus Humano (PVH) tipos 6,11,16 y 18 se propagaron en la bacteria *E. coli*, de acuerdo al método de Sumerter y cols. Una colonia, de la bacteria se inoculó a 10 ml de medio de cultivo Luria-ampicilina (bacto tripton 10 g, bacto extracto de levadura 5 g y NaCl 10 g) de cada uno de los tipos virales con incubación a 37°C toda la noche. Este cultivo se inoculó a 1 Lt del mismo medio, se incubó con agitación a 37°C hasta que el cultivo tuvo una densidad óptica (D.O.) de 0.6, se agregó cloramfenicol (0.1g en 0.4ml de etanol), y nuevamente se mantuvo en incubación a 37°C durante 10 horas. Después de este tiempo el cultivo se enfrió a 0°C y se centrifugó a 10000 rpm (RC5B, rotor SS34) por 5 minutos, la pastilla se lavó con PBS (NaCl 3M, K_2HPO_4 0.2M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25M y KCl 0.5M, pH 7.4) y se repitió la centrifugación. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se agitó en el vortex hasta que se observó un homogenado lechoso. Se añadió 10 ml de amortiguador TES (Tris-base 0.1 M, EDTA 0.1 M, sacarosa 0.3 gr/ml; pH 8.1), la suspensión se vació en un tubo de policarbonato de 50ml y se añadió 20 μl de Dietilpircarbonato (DEPC) para incubarlo en hielo por 5 minutos. Se adicionó 2.5 ml de lisozima recién preparada a 0°C (6 mg/ml en H_2O bidestilada) y se mezcló suavemente. Posteriormente, se agregaron 12.5 ml de una solución de detergentes fría (deoxicolato de sodio 4 mg/ml, brij 58 10 mg/ml, NaCl 2N) se agitó suavemente y se colocó en baño maría a 25°C

por 20 minutos, la mezcla se centrifugó a 13000 rpm (RC58, rotor SS34) durante 30 minutos. El sobrenadante fue decantado en 80 ml de tricloroacetato de sodio 4.5 M-etanol (vol. 1:1), se mezcló totalmente y se colocó en hielo por una hora. Los ácidos nucleicos se empastillaron centrifugando a 9500 rpm (RC58, rotor SS34) y el sobrenadante se desechó. La pastilla se secó y se resuspendió en 7.5 ml de solución de RNasa A (40 mg de RNasa pancreática a 100 ml de acetato de amonio 0.01 N calentada a 80°C durante 15 minutos), se transfirió a un tubo de policarbonato de 50 ml y se incubó a 50°C 1 hora.

Posteriormente se adicionaron 30 ml de tricloroacetato de sodio 4.5 M - etanol, se mezcló, se enfrió a 0°C por 1 hora y se centrifugó a 13000 rpm (RC58, rotor SS34) por 20 minutos. La pastilla se lavó con una solución de etanol:agua (4:1) y se resuspendió en agua bidestilada. Finalmente, se realizó la cuantificación del ADN plásmico a una longitud de onda de 260 y 280 nm en el espectrofotómetro.

AISLAMIENTO DEL ADN VIRAL

Del plásmido bacteriano de cada uno de los virus 6,11,16 y 18 se realizó la extracción del ADN viral de cada uno. El plásmido se digirió con la endonucleasa indicada, se utilizaron las enzimas BamH1 para cortar PVH-6,11,16 y EcoR1 para PVH-18.

De acuerdo a la siguiente mezcla de reacción: 3-5 µg de ADN plásmido, 50 U de endonucleasa (EcoR1 12 U/µl y BamH1 50U/µl), 5 µl de Amortiguador 10X (para BamH1 se utilizó el amortiguador E6 y para EcoR1 el E9) y se aforó con agua bidestilada a 50µl y se incubó a 37°C toda la noche. El ADN digerido se analizó en gel de agarosa 1% y se cortó a 100 volts

durante 2-2.5 horas. Se cortó la banda que corresponde al ADN viral y se sumergió en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% (se preparó de manera similar al agarosa normal); se corrió el gel a 100 volts durante 2 horas. Se cortó el trozo de agarosa que contenía el ADN y se fundió a 70°C durante 10 minutos, después se adicionó amortiguador TE (4 volúmenes), se agitó en el vortex y se centrifugó a 12000 rpm en la microcentrifuga (BECKMAN, microfuge 12) durante 10 minutos, se separó la fase acuosa y se agregó un volumen de fenol-saturado con TE, se agitó en el vortex y se centrifugó a 12000 rpm en la misma microcentrifuga durante 5 minutos, se separó nuevamente la fase acuosa y se adicionó un volumen de fenol-saturado:cloroformo repitiendo la centrifugación. La fase acuosa se separó y se precipitó con 1/10 del volumen de acetato de sodio 3 M pH 5.5 y 2 volúmenes de etanol al 100%, durante 1 hora a -70°C. El ADN precipitado se centrifugó a 12000 rpm durante 20 minutos en las mismas condiciones; y se resuspendió en agua bidestilada. Los fragmentos obtenidos se analizaron en minigeles de agarosa al 1% para confirmar su peso molecular, usando como marcador de peso molecular ADN del bacteriófago λ cortado con HindIII, plásmido bacteriano sin digerir y el plásmido bacteriano digerido.

GOTEO DEL ADN DE LESIONES TEMPRANAS (DOT-BLOT).

El ADN obtenido de las muestras de lesiones tempranas, de controles negativos y de controles positivos fué goteado para su hibridación posterior. Se utilizaron 5 μ g de ADN de lesiones tempranas, de controles negativos (ADN de linfocitos) y de controles positivos (en este caso se trató de PVH-5, PVH-16 y ADN de células HeLa) se aforaron a un volumen final de 50 μ l. A cada uno se adicionó 5 μ l de NaOH 3 M filtrado y se incubaron a 60°C durante 60 minutos. Posteriormente se adicionó 15 μ l de SSC 20X (NaCl

3M, Citrato de sodio 0.3 M) filtrado. Al mismo tiempo, se preparó la cámara para el goteo, en la cual se colocó la membrana de papel de nylon previamente humedecido con agua bidestilada; la cámara se ensambló con la membrana humedecida apretando bien los tornillos bajo vacío. Cuando se tuvo preparada la cámara se procedió a gotear el ADN en cada uno de los pozos cerrando el vacío. Una vez que se goteó el ADN se abrió el vacío hasta que la filtración fué total, entonces se lavó con 500 μ l de SSC 6X para cada pozo, se dejó filtrar el SSC 6X y finalmente se fijó el ADN al papel de nylon introduciéndolo en el horno a 80-85°C durante 90 minutos con vacío a -14 lb de presión. El papel se guardó en una bolsa de plástico a 4°C hasta su hibridación.

TRANSFERENCIA DEL ADN DE CANCER CERVICAL A PAPEL DE NYLON (SOUTHERN-BLOT).

El ADN obtenido de las muestras de carcinoma cervical, del control negativo (ADN de cérvix normal) y el ADN de los controles positivos (PVH-16 y PVH-18) se transfirió a papel mediante la técnica de Southern-Blot. 10 μ g de ADN fueron digeridos con las enzimas de restricción Pst-I y Xba-I. El ADN se digirió de acuerdo a las instrucciones del fabricante, con la mezcla de reacción: 10 μ g de ADN (de carcinoma cervical, del control normal y para el caso de los controles positivos 2-5 μ g), 50 U de enzima (Pst-I 50U/ μ l y Xba-I 25U/ μ l), 5 μ l de amortiguador 10X (amortiguador E5 para Pst-I y E4 para Xba-I) y se aforó a 50 μ l con agua bidestilada. La mezcla se incubó a 37°C durante toda la noche. Una alícuota de la mezcla de reacción se analizó en minigeles de agarosa al 1% para confirmar que las enzimas cortaron, una vez analizados, se sometieron a electroforesis en gel de

agarosa al 1% (en las condiciones descritas) durante toda la noche.

Se utilizó como marcador de peso molecular ADN del bacteriophago λ cortado con Hind-III, así como los controles positivos que fueron PVH-16 y PVH-18, un control negativo (muestra de cérvix normal) y el ADN de las muestras de cáncer cervical. Los gels se observaron en el transiluminador para ver la migración del marcador de peso molecular (en base a la distancia se determinó el peso molecular de las bandas que se obtuvieron después de la hibridación). Posteriormente, se procedió a desnaturalizar el ADN en los gels mediante lavados con HCl 0.025N durante 30 minutos, un segundo lavado con NaOH 0.5 M-NaCl 1 M por 30 minutos y se neutralizó con un lavado de Tris-HCl 0.5 M-NaCl 3 M, pH 7.4 por otros 30 minutos.

Al mismo tiempo, se preparó la cámara de transferencia en la cual se colocó SSC 10X (dentro de la cámara), por encima de la cámara se colocó un puñeta de papel Whatman 3 MM, después dos hojas de papel 3 MM del tamaño del gel. Cuando se terminaron los lavados, el gel se colocó sobre las dos hojas de papel 3 MM con los pozos hacia abajo. Se eliminaron las burbujas de aire y encima del gel se colocó el papel de nylon (Zeta-Probe) previamente humedecido con agua bidestilada, por encima de éste se colocaron otras dos hojas de papel 3MM del mismo tamaño. Después, se colocó papel absorbente y un peso aproximado de 1 Kg y se dejó transferir toda la noche. Una vez terminada la transferencia el ADN se fijó al papel mediante su exposición a la luz ultravioleta por 5 minutos, y se guardó en una bolsa de plástico hasta su hibridación.

PREHIBRIDACION DEL ADN CELULAR.

El ADN fijado en papel de nylon se prehibridó mediante la utilización de amortiguador de prehibridación el cual contenía: 20 ml de formamida 100% , 8 ml de SSPE 20X (NaCl 3.6 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 M y EDTA 0.02 M;), 2 ml de SDS 20%, 2 ml de blotto (leche sveltas) 10%, 2 ml de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) y se aforó a 40 ml con agua bidestilada estéril filtrada. La formamida, el SSPE y el Blotto se filtraron utilizando filtros de 0.45 μM y finalmente se adicionó tanto el SDS como el ADN de esperma de salmón, el cual fué previamente calentado a 70°C por 10 minutos. El amortiguador de prehibridación se agregó al papel dentro de una bolsa de plástico y se incubó a 43°C por 12-24 horas.

MARCAJE RADIOACTIVO DEL ADN VIRAL (SONDA).

El ADN viral de cada uno de los PVH (6,11,16 y 18) y del ADNc del gene celular humano β -Tubulina (este gene se utilizó para confirmar las concentraciones de ADN celular goteado y transferido) se marcó con deoxiciditina 5'(α -32) trifosfato (dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$), usando el kit comercial de "Nick-Translation" de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Amersham). Para el marcaje se preparó una mezcla de reacción que contenía 1 μg de ADN viral, 10 μl de nucleótidos (dATP, dGTP y dTTP), 12 μl de dCTP- $\alpha^{32}\text{P}$, 5 μl de enzima (2.5 U de DNA polimerasa I y 50 μg de DNasa I) y se aforó a 50 μl con agua bidestilada estéril. La mezcla, se incubó durante 90 minutos a 15°C, se precipitó adicionando 5 μl de ADN acarreador (tRNA), 1/10 de acetato de sodio 3M pH 5.5 y 2 volúmenes de etanol absoluto durante 90 minutos a -70°C ó toda la noche a -20°C. Se centrifugó a 12000 rpm en la microcentrifuga (microfuga 12) durante 15 minutos y se resuspendió en agua

bidestilada. La sonda marcada se calentó a ebullición durante 10 minutos y rápidamente se colocó en hielo. Finalmente, se adicionó la sonda al amortiguador de hibridación, se mezcló perfectamente y se agregó al papel prehibridado.

HIBRIDACION DEL ADN CELULAR.

El ADN prehibridado se hibridó utilizando amortiguador de hibridación el cual contenía: 20 ml de formamida, 8 ml de SSPE 20X, 2 ml de SDS, 2 ml de blocco 10%, 2 ml de ADN de esperma de salmón, y dextran sulfato (dextran sulfato 50%, y azida de sodio 2%,) y se aforó a 40 ml con agua bidestilada estéril, en las mismas condiciones que el amortiguador de prehibridación. Por otro lado el ADN usado como sonda (previamente marcada), se desnaturalizó calentandolo a ebullición durante 10 minutos e inmediatamente después se colocó en hielo. La sonda se adicionó al amortiguador de hibridación, se mezcló perfectamente y se agregó al papel prehibridado. El papel se dejó hibridando de 12-24 horas a una temperatura de 43°C .

LAVADO DEL PAPEL HIBRIDADO.

Con la finalidad de eliminar la hibridación inespecifica se realizaron una serie de lavados a los papeles hibridados, utilizando las siguientes soluciones: el primer lavado fué con SSC 2X y SDS 0.1% durante 15 minutos. El segundo lavado fué con SSC 0.5X y SDS 0.1% durante 15 minutos. Los dos últimos lavados fueron con SSC 0.1X y SDS 0.1% durante 30 minutos cada uno; todos los lavados se realizaron a una temperatura de 60-65°C .

Finalmente los papeles lavados fueron expuestos a una película Kodak de rayos X a -70°C con una pantalla intensificadora Dupont Cronex Lightning plus, para detectar las señales del ADN hibridado.

TRAZO DENSITOMETRICO.

Con el fin de determinar de una manera más cuantitativa la cantidad de ADN y así poder determinar cuales muestras de cervix (para el caso de las lesiones tempranas) fueron positivas para PVH se realizó el trazo densitométrico de las autorradiografías de cada papel hibridado y expuesto.

El trazo se realizó colocando en el densitometro las líneas de la autorradiografía previamente recortadas (tomando como base el fondo de la misma) utilizando una densidad óptica de 2.0 y una longitud de onda de 575nm.

Los trazos obtenidos para cada línea fueron comparados con los trazos tanto de los controles negativos como de los controles positivos, obteniendo de esta manera cuales muestras eran positivas para cada tipo de PVH.

RESULTADOS

DETECCION DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (PVH) EN LESIONES TEMPRANAS DEL CERVIX UTERINO.

Con la finalidad de detectar secuencias de ADN viral de PVH en biopsias de lesiones tempranas (pre malignas) del cérvix se realizó la hibridación del ADN obtenido de éstas lesiones con sondas virales de los PVH: 6, 11, 16 y 18 de manera independiente por el método de Dot-blot. Los ADN celulares obtenidos se gotearon en dos papeles Zeta-Probe los cuales se denominaron Dot-blot 1 y Dot-blot 2.

En el Dot-blot 1 se gotearon los ADN obtenidos de un primer bloque de muestras, en donde después de verificar el diagnóstico histopatológico se encontró que 27 de éstos correspondían a lesiones de cérvix y que los 51 restantes pertenecían a otras regiones del órgano genital femenino (vagina, vulva, etc., las cuales no se discutirán en este trabajo).

Por otra parte, se gotó un segundo bloque de lesiones tempranas el Dot-blot 2, el cual después de la verificación histopatológica mostró que 55 de éstas lesiones correspondieron al cérvix y las 21 restantes a lesiones de otras regiones del tracto genital femenino.

En total se analizaron 82 lesiones cervicales, las cuales después de la verificación histológica se distribuyeron de la siguiente manera: 47 lesiones tempranas (NIC I, II y III), 20 condilomas y 15 cérvix histológicamente normales.

a) Detección de PVH-6 y 11 en Lesiones Tempranas.

Las muestras contenidas en el Dot-blot 1 se hibridaron con PVH-6, el papel se expuso en un film de rayos X (autorradiografía) durante 3 días a-70°C

y se encontró que 5 de 27 muestras cervicales fueron positivas para este tipo viral (muestras C-6, A-9, C-10, F-1, E-9). Este virus también se detectó en otras regiones genitales como por ejemplo, las muestras C-12, D-1 y B-11 las cuales son muestras no cervicales (Figura 4). Para confirmar la positividad de las muestras se sometió la autorradiografía a un trazo densitométrico, en el cual los controles positivos (Fig. 4, H-5 y H-7) y los controles negativos (Fig. 4, H-1) se compararon con las señales de las muestras y así discriminar a las negativas y considerar únicamente a las positivas.

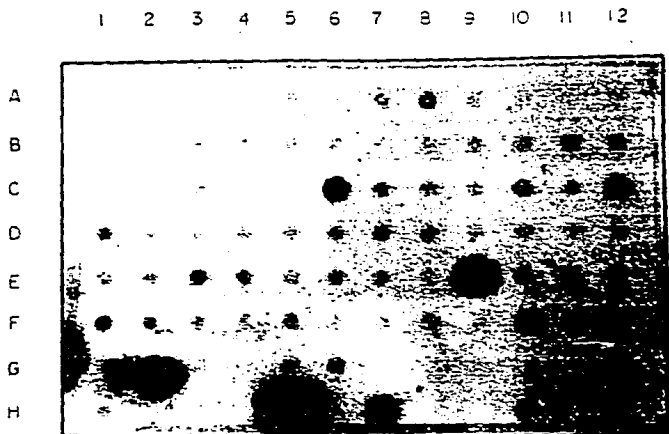
Como ejemplo del análisis densitométrico de las señales se muestra el trazo realizado para la autorradiografía obtenida de la hibridación del Dot-blot 1 con PVH-6, en el cual se observa que las muestras 1 y 7 son positivas para este tipo viral (Figura 5).

Con el fin de comprobar que las muestras que indican presencia de PVH no se debieron a la existencia de una mayor cantidad de ADN celular (o viceversa) y por lo tanto, evitar los falsos positivos (o negativos), se hibridó el ADN de las muestras con el gene normal β -Tubulina (Figura 6 y 7).

Por otro lado, después de analizar el trazo densitométrico de la autorradiografía obtenida de la hibridación del Dot-blot 2 con PVH-6 se encontró que 4 muestras fueron positivas para este tipo viral; las cuales se encuentran en las posiciones A-6, E-8, G-1 y F-6. En la autorradiografía también se observan otras dos señales (G-2 y E-9) que representan muestras de otras regiones diferentes al cérvix, las cuales también resultaron positivas para este tipo viral (Figura 8).

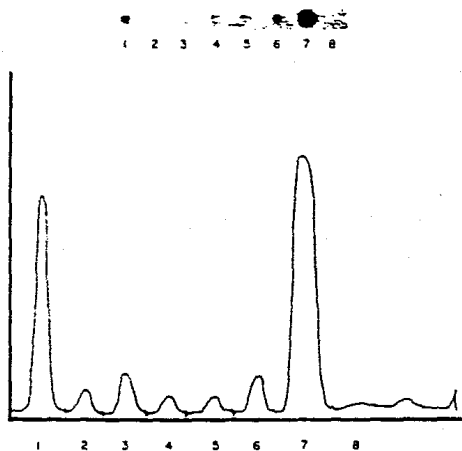
Posteriormente, al hibridar el Dot-blot 1 con PVH-11 y al realizar el trazo densitométrico de su autorradiografía se encontró que, sólo dos ADN celulares (C-6 y E-9) fueron positivos para este tipo viral. Además, las muestras A-5, B-4

FIGURA 4. HIBRIDACION DE LA AUTORRADIOGRAFIA DEL DOT-BLOT 1 (LESIONES TEMPRANAS) CON PVH-6



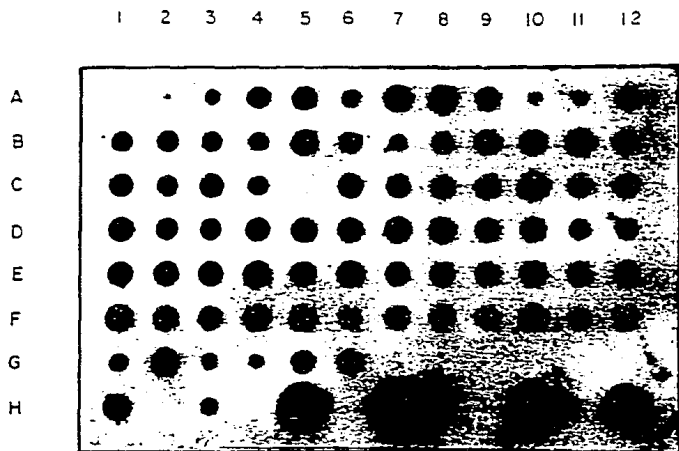
POZO A-1 a G-6 ADN DE LESIONES TEMPRANAS
 POZO H-1 ADN DE LINFOCITOS.
 POZO H-3 ADN DE CELULAS HeLa.
 POZO H-5 y H-7 ADN PLASMIDO DE PVH-6.
 POZO H-10 y H-12 ADN PLASMIDO DE PVH-16.
 LA AUTORRADIOGRAFIA SE DEJO EXPONIE
 DURANTE 3 DIAS.

FIGURA 5. TRAZO DENSITOMETRICO DE UNA LINEA DE LA AUTORRADIOGRAFIA DE ADN DE LESIONES TEMPRANAS DEL CERVIX HIBRIDADO CON PVH-6



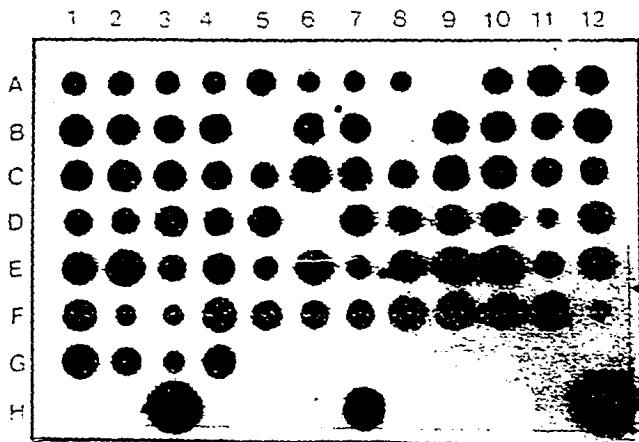
En la parte superior se presenta una línea que contiene 8 muestras de ADN de Lesiones Tempranas Hibridadas con PVH-6 y en la parte inferior se encuentra el trazo densitométrico de la misma línea, el cual, se realizó a una longitud de onda de 575 y a una densidad óptica de 2.0.

FIGURA 6. HIBRIDACION DEL ADN OBTENIDO DE LESIONES TEMPRANAS CON EL GENE NORMAL β -TUBULINA (DOT-BLOT 1).



POZO A-1 a G-6 ADN DE LESIONES TEMPRANAS
 POZO H-1 ADN DE LINFOCITOS.
 POZO H-3 ADN DE CELULAS HeLa.
 POZO H-5 y H-7 ADN PLASMIDO DE PVH-6.
 POZO H-10 y H-12 ADN VIRAL DE PVH-16.
 LA PLACA SE DEJO EXPONIEANDO DURANTE 2 DIAS
 A -70°C

FIGURA 7. 5 μ g DE ADN DE LESIONES TEMPRANAS
HIBRIDADO CON DEL GENE NORMAL β -TUBULINA
(DOT-BLOT 2).



POZO A-1 a G-4 ADN DE LESIONES TEMPRANAS

POZO H-1 ADN VIRAL DE PVH-5

POZO H-3 ADN PLASMIDO DE PVH-6.

POZO H-5 ADN DE LINFOCITOS.

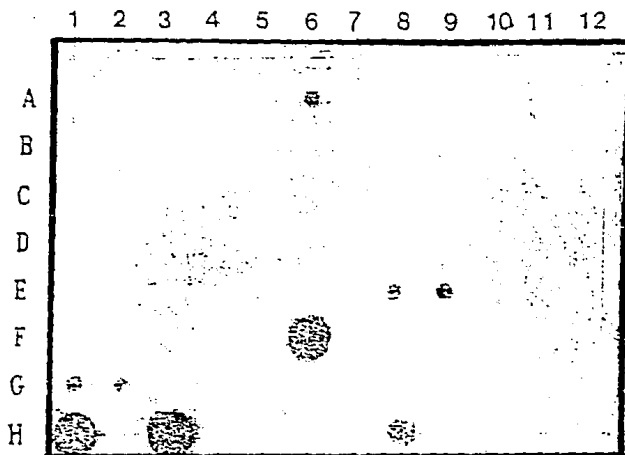
POZO H-7 ADN DE CELULAS HeLa.

POZO H-10 ADN VIRAL DE PVH-15.

POZO H-12 ADN PLASMIDO DE PVH-15.

LA PLACA SE DEJO EXPONIENDO 2 DIAS A -70°C .

FIGURA 8. HIBRIDACION DEL ADN (5 μ g) DE LESIONES TEMPRANAS CON PVH-6 (DOT-BLOT 2).



POZO A-1 a G-4 ADN DE LESIONES TEMPRANAS

POZO H-1 ADN VIRAL DE PVH-6

POZO H-3 ADN PLASMIDO DE PVH-6.

POZO H-5 ADN DE LINFOCITOS.

POZO H-7 ADN DE CELULAS HeLa.

POZO H-10 ADN VIRAL DE PVH-16.

POZO H-12 ADN PLASMIDO DE PVH-16.

LA AUTORADIOGRAFIA SE OBTUVO DESPUES DE 5 DIAS A -70°C.

y C-12 también presentaron secuencias de PVH-11 pero no corresponden a muestras de cérvix (Figura 9).

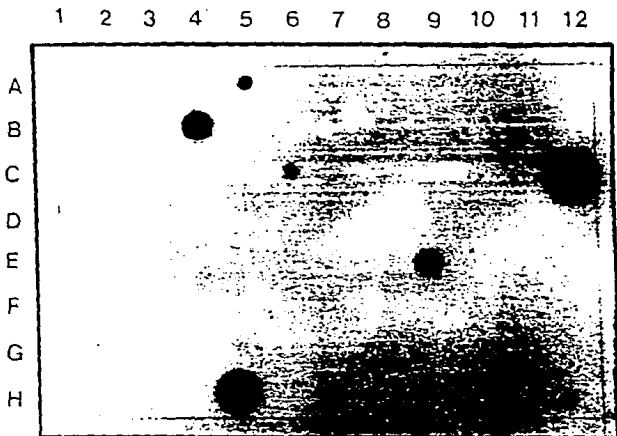
En la autorradiografía obtenida de la hibridación del Dot-blot 2 con PVH-11, se observó que sólo una muestra contenía secuencias de este tipo viral y se encuentra ubicada en la posición F-6 (Figura 10).

Resumiendo, para la detección de PVH 6/11 se mostró que 12 (25.5%) de las 47 lesiones tempranas, 2 (10.0%) de los 20 condilomas y 1 (7.0%) de los 15 cérvix histológicamente normales fueron positivos para estos tipos virales (Cuadro 6). Además, al realizar la división de las lesiones tempranas de acuerdo a su grado de agresividad se encontró que, el 25% (1 de 4) de las NIC I, el 42.8% (6 de 14) NIC II y el 17.2% (5 de 29) de las NIC III fueron positivas para PVH 6/11 (Cuadro 7).

CUADRO 6. PRESENCIA DE PVH EN CONDILOMAS, LESIONES TEMPRANAS DEL CERVIX Y CERVIX HISTOLOGICAMENTE NORMAL.

TIPO DE LESION	NUM. DE CASOS	PVH 6/11	PVH 16/18
CONDILOMA	20	2(10.0%)	----
LES. TEMPRANAS	47	12(25.5%)	3(6.4%)
HIST. NORMALES	15	1(7.0%)	----
TOTALES	82		

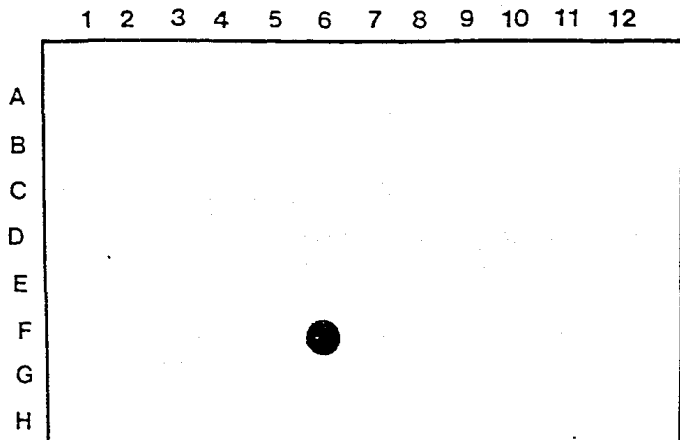
FIGURA 9. DETECCION DE PVH-11 EN EL ADN OBTENIDO DE LESIONES TEMPRANAS MEDIANTE HIBRIDACION DOT-BLOT (DOT-BLOT 1).



POZO A-1 a G-6	ADN DE LESIONES TEMPRANAS
POZO H-1	ADN DE LINFOCITOS.
POZO H-3	ADN DE CELULAS HeLa.
POZO H-5 y H-7	ADN PLASMIDO DE PVH-6.
POZO H-10 y H-12	ADN PLASMIDO DE PVH-16.

EL PAPEL SE DEJO EXPONRIENDO 6 DIAS A -70°C

FIGURA 10. PRESENCIA DE PVH-11 EN 5 μ g DE ADN DE LESIONES TEMPRANAS MEDIANTE HIBRIDACION DOT-BLOT (DOT-BLOT 2).



POZO A-1 a G-4 ADN DE LESIONES TEMPRANAS
POZO H-1 ADN VIRAL DE PVH-6
POZO H-3 ADN PLASMIDO DE PVH-6.
POZO H-5 ADN DE LINFOCITOS.
POZO H-7 ADN DE CELULAS HeLa.
POZO H-10 ADN VIRAL DE PVH-16.
POZO H-12 ADN PLASMIDO DE PVH-16.

EL PAPEL SE DEJO EXPONRIENDO A -70°C DURANTE 4 DIAS.

CUADRO 7. DETECCIÓN DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (PVH) EN LESIONES TEMPRANAS DEL CERVIX DE ACUERDO AL GRADO DE LA LESION, MEDIANTE HIBRIDACION DOT-BLOT.

TIPO DE LESION	NUMERO DE CASOS	POSITIVOS 6/11	POSITIVOS 16/18
NIC I	4	1 (25.0%)	0
NIC II	14	6(42.8%)	1(7.1%)
NIC III	29	5(17.2%)	2(7.0%)
TOTAL	47	12(25.5%)	3(6,4%)

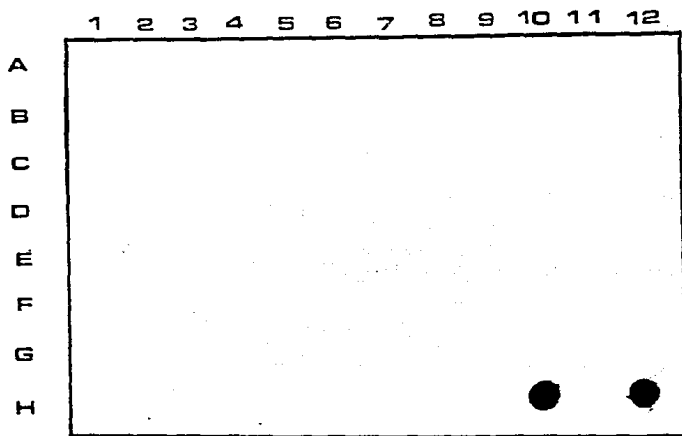
c) Detección de PVH-16 y PVH-18 en Lesiones Tempranas..

Al realizar el trazo densitométrico de la hibridación del Dot-blot 1 con PVH-16 se encontró que ninguna muestra de lesiones tempranas fue positiva para este tipo viral (Figura 11).

Por otra parte, el Dot-blot 2 al hibridarse con PVH-16 mostró que sólo una muestra fue positiva para este tipo viral (muestra F-6); además, la muestra D-4 también fue positiva para este virus, pero esta muestra no corresponde a un ADN cervical (Figura 12)

En lo que respecta a la hibridación del Dot-blot 1 con PVH-18 se encontró que la muestra B-4 contenía secuencias de este tipo viral (Figura 13).

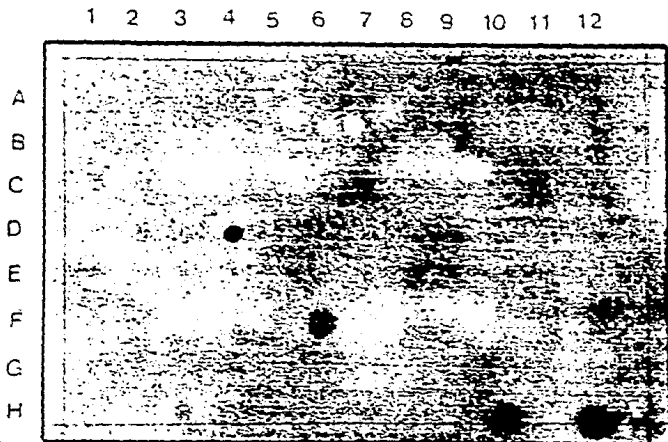
FIGURA 11. HIBRIDACION DEL ADN OBTENIDO DE LESIONES TEMPRANAS CON PVH-16 (DOT-BLOT 1).



POZO A-1 a G-6	ADN DE LESIONES TEMPRANAS
POZO H-1	ADN DE LINFOCITOS.
POZO H-3	ADN DE CELULAS HeLa.
POZO H-5 y H-7	ADN PLASMIDO DE PVH-6.
POZO H-10 y H-12	ADN PLASMIDO PVH-16.

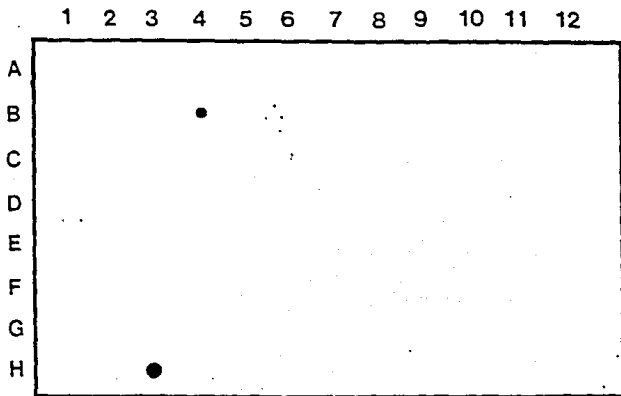
AUTORRADIOGRAFIA OBTENIDA DESPUES DE 5 DIAS DE EXPOSICION A -70°C .

FIGURA 12. DETECCION DE PVH-16 EN EL ADN OBTENIDO DE LESIONES TEMPRANAS POR HIBRIDACION DOT-BLOT (DOT-BLOT 2).



POZO A-1 a G-4 ADN DE LESIONES TEMPRANAS
 POZO H-1 ADN VIRAL DE PVH-6
 POZO H-3 ADN PLASMIDO DE PVH-6.
 POZO H-5 ADN DE LINFOCITOS.
 POZO H-7 ADN DE CELULAS HeLa.
 POZO H-10 ADN VIRAL DE PVH-16.
 POZO H-12 ADN PLASMIDO DE PVH-16.
 LA AUTORADIOGRAFIA SE OBTUVO DESPUES DE 5 DIAS
 A -70°C.

FIGURA 13. DETECCION DE PVH-18 EN EL ADN DE LESIONES TEMPRANAS POR HIBRIDACION (DOT-BLOT 1).



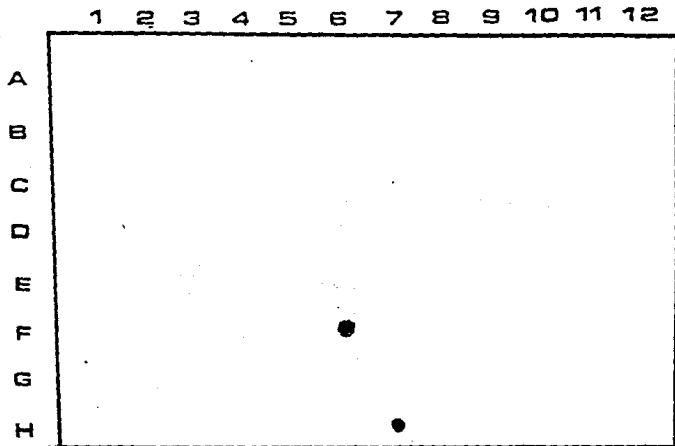
POZO A-1 a G-6	ADN DE LESIONES TEMPRANAS
POZO H-1	ADN DE LINFOCITOS.
POZO H-3	ADN DE CELULAS HeLa.
POZO H-5 y H-7	ADN PLASMIDO DE PVH-6.
POZO H-10 y H-12	ADN VIRAL DE PVH-16.

EL PAPEL SE EXPUSO A -70°C DURANTE 6 DIAS.

Finalmente, la autorradiografía obtenida después de la hibridación del Dot-blot 2 con PVH-18 presentó 1 ADN celular positivo para este tipo viral, el cual se encuentra en la posición F-6 (Figura 14).

En resumen, se detectó la presencia de PVH 16/18 en el 6.4% (3 de 47) de las lesiones tempranas, en tanto que, en los condilomas y cérvix normal no se encontraron secuencias de éstos tipos virales (Cuadro 6). De acuerdo al grado de la lesión temprana se encontraron secuencias de los PVH 16 y 18 en el 7.1% (1 de 4) de los casos de NIC II y en el 7.0% (2 de 29) de los NIC III (Cuadro 7).

FIGURA 14. 5 μ g DE ADN OBTENIDO DE LESIONES TEMPRANAS HIBRIDADO CON ADN VIRAL DE PVH-18 POR EL METODO DOT-BLOT (DOT-BLOT 2).



POZO A-1 a G-4 ADN DE LESIONES TEMPRANAS
 POZO H-1 ADN VIRAL DE PVH-6
 POZO H-3 ADN PLASMIDO DE PVH-6.
 POZO H-5 ADN DE LINFOCITOS.
 POZO H-7 ADN DE CELULAS HeLa.
 POZO H-10 ADN VIRAL DE PVH-16.
 POZO H-12 ADN PLASMIDO DE PVH-16.

EL PAPEL SE DEJO EXPONRIENDO A -70°C DURANTE 3 DIAS

DETECCION DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (PVH) EN CANCER CERVICAL AVANZADO.

Con el objetivo de detectar secuencias de PVH tipos 6, 11, 16 y 18 en biopsias de Carcinoma Cérvico Uterino (CaCu), se realizó la hibridación del ADN celular obtenido de las biopsias con el ADN de cada virus mediante la técnica Southern-blot.

Este análisis se realizó por duplicado, utilizando para ello 2 enzimas de restricción diferentes: Pst-I para las hibridaciones con PVH-16 y Xba-I para las hibridaciones con PVH-18. Dado que se conocen los patrones de bandas para cada tipo viral con las enzimas, permitiendo así distinguir entre un tipo y otro.

Se analizaron 70 muestras de CaCu y el ADN fue transferido a 14 papeles (7 de los cuales corresponden al corte con Pst-I y los otros 7, al corte con Xba-I). Los papeles se nombraron en orden progresivo de acuerdo a como fueron obtenidos, por lo tanto se tienen desde el papel G-1 hasta el G-16.

a) Detección de PVH 6 y 11 en Cáncer Cervical Avanzado.

En lo que respecta al análisis de PVH-6 y 11 para CaCu, sólo se realizó la hibridación de 40 muestras (tomadas al azar). Esto debido a que se consideró la premisa de que éstos tipos virales se presentan raramente en CaCu (90,91).

Se hibridaron 20 muestras para el corte con Pst-I, y 20 para Xba-I con ambos tipos virales y se expusieron en un film de rayos X durante una semana a -70°C y no se detectaron secuencias de estos tipos virales. Por lo tanto, no fueron considerados posteriormente y el análisis se enfocó el análisis a los tipos 16 y 18.

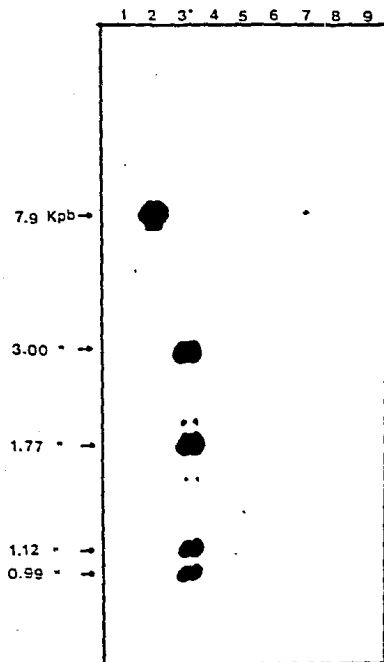
b) Detección de PVH 16 y 18 en Cáncer Cérvico Uterino.

Los ADN de CaCu cortados con Pst-I se hibridaron con PVH-16, en tanto que, los que fueron cortados con Xba-I se hibridaron con PVH-18. En cada papel se transfirieron, las muestras de ADN de CaCu, un control negativo (ADN de cérvix normal), 2 controles positivos (ADN viral de PVH-16 y de PVH-18) y el marcador de peso molecular λ cortado con Hind III, el cual presenta 8 bandas: 23.1 Kilopares de bases (Kpb), 9.4 Kpb, 6.5 Kpb, 4.36 Kpb, 2.3 Kpb, 2.02 Kpb, 0.564 Kpb y 0.125 Kpb (de las cuales en los geles sólo se alcanzaron a distinguir las 6 primeras).

Por otro lado, los papeles G-2 y G-5 se realizaron con la finalidad de conocer el patrón de bandas así como el peso molecular de cada una al cortar PVH-16 con Pst-I y PVH-18 con Xba-I. El PVH-16 cortado con Pst-I, mostró 4 bandas: la primera de peso molecular aproximado de 2.9-3.0 Kpb, una segunda de 1.7 Kpb, la tercera de 1.12 Kpb y la última de 0.9 Kpb, en tanto que, este virus no tiene sitios de corte para Xba-I observándose al ADN completo (Figura 15). Por otro lado, el PVH-18 cortado con Xba-I presentó un patrón de 4 bandas, cada una con peso molecular de 4.4-4.5 Kpb, 3.6 Kpb, 2.5 Kpb y 1.3 Kpb, este a su vez fue cortado con HindIII y se observó que ésta enzima no corta al PVH-18 (Figura 16).

El papel G-10 contenía 10 muestras de CaCu cortadas con Pst-I, éstas se hibridaron con sonda viral de PVH-16 y se encontró que 2 muestras fueron positivas para este tipo viral; las cuales se ubican en los carriles 8 y 12 (Figura 17). A su vez, el papel G-8 que también contenía ADN de CaCu cortado con Pst-I al hibridarse con PHV-16 mostró que la muestra del carril 13 fue positiva para este tipo viral (Figura 18).

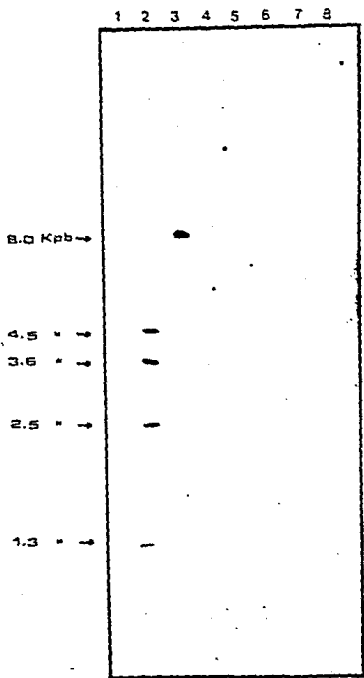
FIGURA 15. ANALISIS DE PVH-16 EN 10 μ g DE ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Pst-I POR HIBRIDACION CON PVH-16 (G-2)



- CARRIL 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR λ CORTADO CON HindIII.
 LAS BANDAS DEL MARCADOR TIENEN PESO MOLECULAR DE 23.3 Kpb
 9.4Kpb, 6.5Kpb, 4.3Kpb, 2.3Kpb, 2.02Kpb, 0.564Kpb, 0.125Kpb)
- CARRIL 2. ADN VIRAL DE PVH-16 CORTADO CON Xba-I.
- CARRIL 3. ADN VIRAL DE PVH-16 CORTADO CON Pst-I.
- CARRIL 4. ADN VIRAL DE PVH-18 CORTADO CON Pst-I.
- CARRIL 5. ADN DE CERVIX NORMAL CORTADO CON Pst-I.
- CARRIL 6 A 9. ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Pst-I
 (MUESTRAS 64,56,71,51).

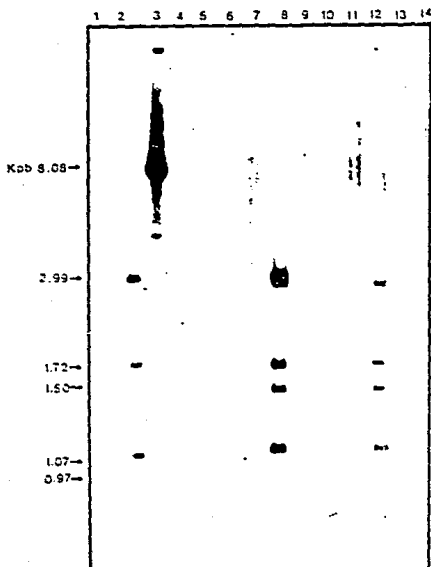
EL PAPEL SE DEJO EXPONIENDO A 70°C DURANTE 3 DIAS

FIGURA 16. DETECCION DE PVH-18 EN EL ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Xba-I POR HIBRIDACION CON PVH-18 (G-5)



- CARRIL 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR λ HINDIII.
CARRIL 2. ADN VIRAL DE PVH-18 CORTADO CON Xba-I
CARRIL 3. ADN VIRAL DE PVH-18 CORTADO CON Hind-III.
CARRIL 4. ADN DE CERVIX NORMAL CORTADO CON Xba-I.
CARRIL 5 A 8. ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Xba-I
LA PLACA SE DEJO EXPONIENDO 5 DIAS A -70°C .

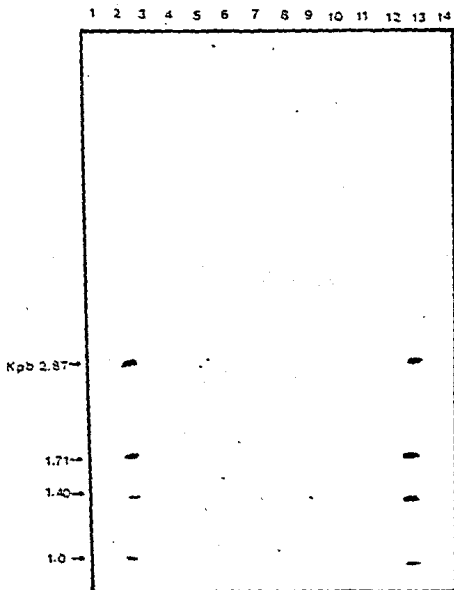
FIGURA 17. PRESENCIA DE PVH-16 EN EL ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Pst-I, HIBRIDADO CON PVH-16 (G-10)



CARRIL 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR λ CORTADO CON HindIII.
 CARRIL 2. ADN VIRAL DE PVH-16 CORTADO CON Pst-I.
 CARRIL 3. ADN VIRAL DE PVH-16 CORTADO CON Xba-I.
 CARRIL 4. ADN DE CERVIX NORMAL CORTADO CON Pst-I
 CARRIL 5 A 14. ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Pst-I
 (MUESTRAS 147, 98, 145, 124, 118, 95, 54, 112, 53, 52).

EL PAPEL SE EXPUSO A -70°C DURANTE 6 DIAS.

FIGURA 18. DETECCION DE PVH-16 EN ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Pst-I E HIBRIDADO CON PVH-16 (G-8)



CARRIL 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR λ CORTADO CON *HindIII*.
 CARRIL 2. ADN VIRAL DE PVH-16 CORTADO CON *Pst*-I.
 CARRIL 3. ADN VIRAL DE PVH-18 CORTADO CON *Xba*-I.
 CARRIL 4. ADN DE CERVIX NORMAL CORTADO CON *Pst*-I
 CARRIL 5 A 14. ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON *Pst*-I
 (MUESTRAS 134, 121, 126, 116, 111, 84, 130, 96, 129, 120).

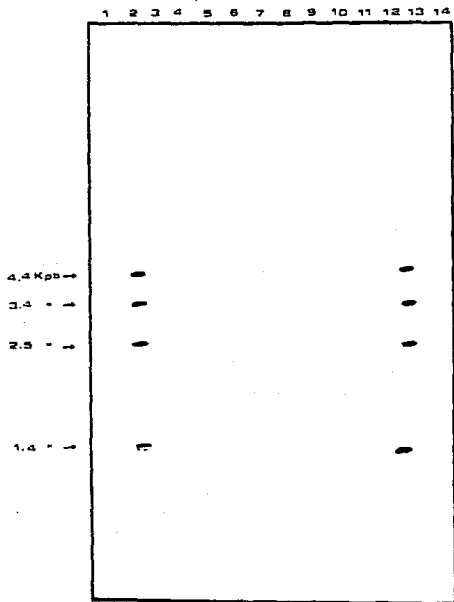
De manera similar, los 5 papeles restantes que contenían ADN de CaCu cortado con Pst-I (G-1,G-3,G-6,G-12,G-15) e hibridados con PVH-16, los cuales no son mostrados a fin de que los resultados no sean repetitivos. Finalmente se encontró que el 24.2% de los 70 casos analizados para el corte con Pst-I presentaron muestras positivas para este tipo viral. Se encontró que, presentaron secuencias de PVH-16 (Cuadro 9).

En lo que respecta a la detección de PVH-18 en CaCu, se observó que el papel G-4 mostró un ADN positivo para este tipo viral, el cual se ubica en el carril 13 (Figura 19).

En el papel G-7 se detectó la presencia de secuencias de PVH-18 en 2 muestras ubicadas en los carriles 5 y 6 (Figura 20).

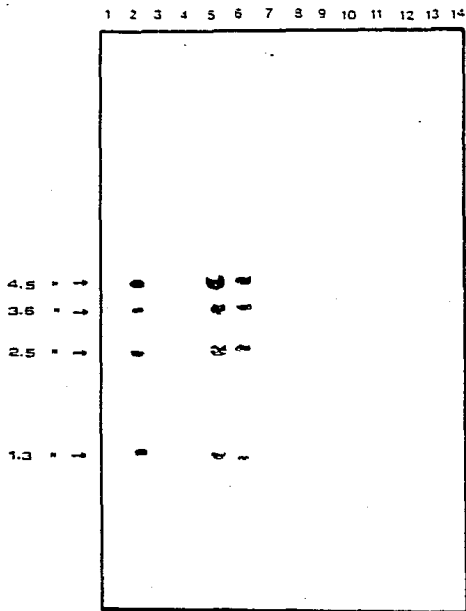
Finalmente, el 10% (7 de 70) de los ADN de CaCu cortados con Xba-I, presentaron positividad para PVH-18. Además, cuando se realizó la verificación del diagnóstico histopatológico se encontró que, los carcinomas epidermoides presentan secuencias de PVH-16/18 en el 27.2% (15 de 55) de las muestras. En tanto que, los carcinomas adenoescamosos y los adenocarcinomas presentan secuencias de estos mismos tipos virales en 6 de 10 (60 %) y 3 de 5 (60%) muestras respectivamente (Cuadro 8).

FIGURA 19. DETECCION DE PVH-18 EN EL ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Xba-I E HIBRIDADO CON PVH-18 (G-4)



- CARRIL 1.** MARCADOR DE PESO MOLECULAR λ CORTADO CON HindIII.
CARRIL 2. ADN VIRAL DE PVH-16 CORTADO CON Xba-I.
CARRIL 3. ADN VIRAL DE PVH-18 CORTADO CON Xba-I.
CARRIL 4. ADN DE CERVIX NORMAL CORTADO CON Xba-I
CARRIL 5 A 14. ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Xba-I
 (MUESTRAS 56,59,59,51,55,52,53,58,54,70).

FIGURA 20. PRESENCIA DE PVH-18 EN EL ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Xba-I E HIBRIDADO CON E PVH-18 (G-7)



CARRIL 1. MARCADOR DE PESO MOLECULAR λ CORTADO CON HindIII.
 CARRIL 2. ADN VIRAL DE PVH-18 CORTADO CON Xba-I.
 CARRIL 3. ADN DE CERVIX NORMAL CORTADO CON Xba-I.
 CARRIL 4 A 12. ADN DE CANCER CERVICAL CORTADO CON Xba-I
 (MUESTRAS 65,57,76,110,123,89,115,119,132).

CUADRO 8. DETECCION DE PAPILOMAVIRUS HUMANO (PVH) EN CANCER CERVICO UTERINO AVANZADO MEDIANTE HIBRIDACION SOUTHERN-BLOT.

TIPO HISTOPATOLOGICO	NUM. DE CASOS	POSITIVOS PVH 6/11	POSITIV. PVH-16	POSITIV. PVH-18
Ca. EPIDERMOIDE	55	----	11(20.0%)	4 (7.2%)
Ca. ADENOESCAMOSO	10	----	4(40.0%)	2(20.0%)
ADENOCARCINOMA	5	----	2(40.0%)	1(20.0%)
TOTAL	70	----	17(24.3%)	7(10.0%)

DISCUSION

El conocimiento de las características de los Papilomavirus Humano (PVH) ha permitido detectarlos mediante hibridación, con lo que a su vez se espera conocer qué papel juegan en el cáncer cervical.

En este trabajo se evaluó la presencia de PVH tipos 6, 11, 16 y 18 tanto en 47 ADN obtenidos de biopsias de lesiones tempranas como en 70 ADN de carcinoma cérvico-uterino.

Debido a la poca cantidad de ADN obtenido de las lesiones tempranas así como los recursos con los que se contaba en el laboratorio, la detección de secuencias de PVH en estas lesiones se realizó mediante el método de hibridación Dot-blot; ya que, este método permite detectar secuencias específicas a partir de 1µg de ADN, en contraste con otros métodos como por ejemplo, el Southern-blot para el cual se recomienda utilizar mínimo 10µg de ADN (84,85). Por otro lado, la cantidad de ADN obtenido de las biopsias de cáncer cervical fue suficiente para realizar la detección de PVH mediante la técnica de hibridación Southern-blot.

DETECCION DE PAPILOMAVIRUS HUMANO EN LESIONES TEMPRANAS.

Los resultados de detección de PVH en las lesiones tempranas, mostraron señales con distinto grado de intensidad y, ésta se encuentra relacionada con el mayor o menor grado de positividad (a mayor intensidad de la señal mayor número de copias virales y por lo tanto mayor positividad) (96); lo que indica que existen muestras con un grado de infección mayor que otras.

Por otro lado, se observaron algunas hibridaciones cruzadas entre controles y las sondas de PVH utilizadas. Por ejemplo, la hibridación del Dot-blot 1, en donde se presentó una hibridación entre la sonda de PVH-11 y el control positivo para PVH-6, la cual se presentó a pesar de que se utilizaron condiciones de alta astringencia (el término astringencia se refiere al grado de discriminación entre uniones inespecíficas o hibridaciones cruzadas y las específicas) (64). Las hibridaciones cruzadas fueron debidas a que el método Dot-blot puede ser influenciado por varios factores como: el uso del ADN completo lo que origina que aquellas secuencias muy parecidas tiendan a hibridar (como el caso de los PVH-11 y PVH-6, los cuales presentan el 25% de homología entre ellos y por tanto en algunas ocasiones llegan a hibridar), las contaminaciones, variaciones de temperatura en el momento de prehibridar y de hibridar (85,96).

No en todos los casos se presentaron hibridaciones cruzadas como por ejemplo, la detección de PVH-16 y 18 en estas mismas lesiones, en donde se observa que hibridaron exclusivamente los controles positivos y las muestras positivas para estos tipos virales. Sin embargo, los resultados obtenidos para lesiones tempranas deben considerarse con reserva, hasta no haber realizado una confirmación de los mismos utilizando otros métodos de hibridación más sensibles como por ejemplo, el método Southern-blot ó al de Amplificación de ADN por Reacción en Cadena de Polimerasa (conocido como PCR).

Finalmente, debido a que en México no existen estudios que involucren a las lesiones tempranas, no hay forma de comparar estos resultados, sin embargo, es necesario buscar un mecanismo que permita obtener resultados más reales en lo que respecta a éstas lesiones.

DETECCION DE PAPILOMAVIRUS HUMANO EN CANCER CERVICAL AVANZADO.

El método Southern-blot permitió detectar la presencia de PVH en el ADN de 70 biopsias de CaCu así como identificar el tipo específico que se encontraba infectando las células.

Los ADN (control y problema) se cortaron con Pst-I y con Xba-I, debido a que el patrón de bandas de los tipos virales en estudio para éstas enzimas ya está bien establecido, evitando así cualquier confusión al interpretar los resultados.

No se hibridaron todos los ADN celulares de cáncer cervical avanzado con PVH 6 y 11, debido a que se ha reportado que éstos virus se presentan muy raramente en CaCu (90,91) y, partiendo de esta premisa, se analizaron 40 muestras al azar, en donde ninguna muestra fue positiva. Por lo tanto, el análisis se enfocó en los PVH-16 y PVH-18, los cuales se han asociado principalmente al cáncer cervical (90,91).

Los patrones de bandas obtenidos para los tipos virales 16 y 18 fueron similares a los reportados por otros autores que han empleado las mismas sondas (54). Sin embargo, los pesos moleculares de las bandas varían en un rango de 0.1-0.3 Kpb. Las variaciones se originaron en el momento de medir la distancia que recorrió el marcador de peso molecular y de las bandas problema, puesto que, esta observación depende de la persona que realice el cálculo. Además, el peso molecular también está afectado por la definición de la banda, es decir, las bandas bien definidas facilitan la medición, en tanto que, las bandas gruesas la dificultan y consecuentemente el peso molecular varía, no obstante, la variación se encuentra dentro de un rango normal.

De manera similar a las lesiones tempranas, en las hibridaciones southern-blot la intensidad de las bandas indica la presencia de un número mayor o menor de copias virales en las muestras.

Los porcentajes de presencia de PVH-16 (24.3%) y PVH-18 (7.0%) encontrados en este trabajo difieren un poco de lo reportado por otros autores tales como Gariglio y cols., (67) quienes reportan presencia de secuencias de PVH-16 en el 31% (5 de 16) de los casos de CaCu analizados y González, et. al. (93), que reportan secuencias de PVH-18 en el 7% de los casos analizados. Sin embargo, esta variación no es grande por lo tanto se pueden considerar como similares.

Si bien, es cierto que los resultados obtenidos varían con lo reportado en otros países, es necesario considerar algunos factores propios de la población en estudio que influyan en la presencia y detección de PVH; puesto que es conocido que el cáncer resulta de un proceso multifactorial, en donde se requiere la suma de diversos eventos que dan lugar a una transformación maligna. Por lo tanto, es un tanto difícil realizar comparaciones entre lo reportado y lo que se obtuvo en este trabajo sin antes realizar la caracterización de la población (considerando todos los factores intrínsecos de la misma, que pueden influir en la presencia de PVH) y en base a ello establecer si existen diferencias significativas.

Otro punto a considerarse, es la sensibilidad del método de hibridación utilizado (Southern-blot). Este método es muy sensible (84,85), sin embargo, aún con la alta sensibilidad del método, no sea posible detectar el virus en las muestras con menos de una copia del ADN viral por célula, por lo tanto, se requirieron estudios con métodos más sensibles (como el PCR).

No obstante, considerando que los porcentajes (tanto los reportados como los obtenidos) no son mayores al 50%, entonces, la posibilidad de que

los tipos 16 y 18 no sean los prevalentes en la población no debe descartarse. Sin embargo, es muy aventurado realizar cualquier tipo de aseveración sin antes caracterizar a la población estudiada y además efectuar pruebas en las que se analicen otros tipos virales.

CONCLUSIONES

- Los resultados obtenidos en este trabajo para lesiones tempranas muestran que el método Dot-blot no es el más adecuado para detectar las secuencias de PVH en éstas lesiones, puesto que se presentan hibridaciones inespecíficas. Consecuentemente, los porcentajes de presencia de PVH para estas lesiones deben ser considerados con reserva, hasta no ser confirmados con otros métodos de hibridación más sensibles.

- Con respecto a los resultados de presencia de PVH en lesiones invasoras, se encontró que éstos son similares a lo reportado en México, por otros autores. Coincidiendo en una baja frecuencia de secuencias de PVH tipos 15 y 18, lo cual hace necesario realizar estudios en donde se analicen otros tipos virales asociados a cáncer cervical tales como PVH-31, 33 y 35.

- Por otro lado, en población estudiada con las lesiones invasoras prevaleció la presencia de PVH-16 y 18 (considerados de alto riesgo) sobre la de los tipos 6 y 11 (considerados de bajo riesgo), manteniendo de esta manera la tendencia reportada en repetidas ocasiones.

- Finalmente, no se debe descartar la posibilidad de que los porcentajes de PVH en cáncer cervical se encuentren influenciados por factores intrínsecos de la población estudiada, por lo que sería recomendable llevar a cabo la caracterización profunda de la misma.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Harrison T.R., Petersdorf R.G., Adams R.D., Braunwald E., Isselbacher K.J., Martín J.B., Wilson J.D., (1985); Principios de Medicina Interna; 6a. Edición; Ed. McGraw-Hill; Vol. I; pp. 1752.
- 2.- De Vita; Hellman V.T., Rosenberg S., (1982); Cancer Principles & Practice of Oncology; Ed. J.B. Lippincott Co. USA, pp. 3-56.
- 3.- Medrano, L. (1975); Células, Virus y Cáncer; Ed. Blume; Barcelona, España; pp. 75-107.
- 4.- Robbins, S.L., (1988); Patología estructural y funcional; Ed. Interamericana, México; pp. 1409.
- 5.- Klein E., Beeker S., Swemyr E., Jundal M., y Vanky F., (1982); Tumor Cells; Am. J. Cancer, 29:545-550.
- 6.- Correa P., Arias-Stella J., Pérez-Tamayo R., Carbonell M.L., (1975); Texto de Patología, 2a. Ed.; Edit. Prensa Médica, México; pp. 789.
- 7.- Kadish S.A., Burk D.R., Krees Y., (1986); Human Papillomaviruses of Different Types in Precancerous Lesions of the Uterine Cervix Histologic, Immunocytochemical and Ultrastructural Studies; Hum. Pathol., 17:384-392.
- 8.- Mateu Aragonés J.M., (1982); Cáncer de Utero: Diagnóstico Precoz del Carcinoma Cérvico Uterino y Endometrial; Ed. JIMS S.A.; Barcelona, España; pp. 515.

- 9.- Davy M.L.,(1978); The Natural History of Cervical Cancer; En: Veronesi P., Di Re E.; Le Neoplasie del Apparato Genitale Femminile; C.A., Ambrosiana Milano, pp. 79.
- 10.- Fentanes T.E., Guevara C.E.,(1980); Citología Clínica; Ed. Prensa Médica Mexicana, México; pp. 29-98.
- 11.- Václavincova V., Hedman A.K. y Naslell K.,(1978); Follow-up studies in dysplasia and cancer *in situ* of de cervix uteri; Acta Obstet. Gynecol. Scand., 57-69.
- 12.- Richart R.M.,(1975); Cervical Intraepithelial neoplasia; En: Pathology Annual (Summers S.C., ed.); Appleton-Century-Crofts; New York; Vol. 10; pp.301-329.
- 13.- Nouvo J.G., Pedemonte M.B.,(1990); Human Papillomavirus Types and Recurrent cervical Warts; JAMA 263:1223-1226.
- 14.- Meisels A.,Fortin R., y Roy M.,(1977); Condylomatous lesions of the cervix and vagina study. II. Cytologic, Colposcopic and Histopathologic Study; Acta Cytol., 21:379-384.
- 15.- Meisels A., y Fortin R.,(1976); Cpndylomatous lesions of the cervix and vagina; I. Cytologic, Patterns; Acta Cytol., 20:505-515.
- 16.- Mateu-Aragonés J.M., (1981); Carcinoma *in situ* endocervical. Dificultades diagnósticas; Rev. Esp. Obstet. Ginecol., 40:565-570.
- 17.- Syrjänen K.J.,(1980); Current Views on the Condylomatous Lesions in Uterine Cervix and Their Possible Relationship to Cervical Squamous Cell Carcinoma; Obstet. and Gynecol. Survey. 35:685-694.

- 18.- Ashley J.B.,(1966); Evidence for the existence of two forms of cervical carcinoma; J. Obstet. Gynecol. Brit. Cwith; 73:373-380.
- 19.- Brescia R.J., Jenson A.B.,Lancaster W.D., y Kurman R.J.,(1966); The Role of Human Papillomaviruses in the Pathogenesis and Histologic Classification of Precancerous Lesions of the Cervix; Human Pathology 17:552-559.
- 20.- Reeves W.C. Briton L.A., et.al., (1965); Case-control study of cervical cancer ; En: Herrera Provice, Republic Panama. INT. J. Cancer 36:55-60.
- 21.- Barroso E., Rendón J., Medina R.,Mora T., De la Mora S.,(1966); Registro Nacional del Cáncer: Estado actual y Perspectivas; Rev. del INC 32(3 y 4):190-203.
- 22.- Cramer D.W., (1962); Uterine Cervix. En: SchottenfeldD. y Fraumeni J. (eds) Cancer Epidemiology and Prevention. WB Saunders. pp. 78.
- 23.- Mckay D.G., Terjanian B.,Pascychioda D., Younge P.A., y Hertig,A.T.,(1959); Clinical and Pathologic significance of anaplasia (atypical hyperplasia) of the cervix uteri; Obstet. and Ginec., 14:2-7.
- 24.- Syrjanen K.,(1960); Condylomatous Epithelial Changes in the Uterine Cervix and their Relation ship to Cervical Carcinogenesis; Int. J. Gyneacol. Obstet., 17:415-420.
- 25.- Carmichael J.A., Clarke D.H., et.al.,(1966); Cervical Cancer in Women aged 34 and younger; Am. J. Obstet. Gynecol., 254:264-269.
- 26.- Doll R.,(1965); Invasive cervical cancer and combined oral contraceptives; Brit. Med. J., 290:1210-1218.

- 27.- Kjaer S.K., Engholm G., Tersen C., Hugaard J.B., Lyng E., y Jensen O.M.,(1990); Risk Factors For Cervical Human Papillomavirus and Herpes Simplex Virus Infections in Greenland and Denmark: A Population-based Study; Am. J. of Epid., 131(4):669-682.
- 28.- Reeves C.W., Rawls E.W., y Brinton A.L.,(1989); Epidemiology of Genital Papillomavirus and Cervical Cancer; Rev.Inf. Dis.,11(3):426-439.
- 29.- Rotkin I.D.,(1967); Adolescent Coitus and Cervical Cancer:Association of Related Events With Increased Risk; Cancer Res. 27:603-617.
- 30.- Brinton L.A. Hamman R.F., Huggins G.R., Lehman H.F., Levine R.S., Mallin K., Fraumeni J.R. Jr., (1967); Sexual and Reproductive Risk Factors for Invasive Squamous Cells Cervical Cancer; JNCI 79:23-30.
- 31.- Rotkin I.D.,(1981); Etiology and Epidemiology of cervical cancer. En: Dallebach-Hellweg (ed); Current Topics in Pathology: Cervical Cancer; American Press Inc.; pp. 61-111.
- 32.- La Vecchia C., Franceschi S., Decarli A., Gentile A., Fasoli M., (1984); Dietary Vitamin A and the Risk of Invasive cervical cancer; Int. J. Cancer, 34:319-325.
- 33.- Wylie-Rosset J.A., Romney S.L. (1994); Influence of Vitamin A on Cervical Dysplasia and Carcinoma *in situ* ; Nutr. Cancer 6(1):49-57.
- 34.- Brinton L.A., Huggins G.R.,(1986); Long-Term use of oral contraceptives and risk of cervical cancer; Int. J. Cancer 38:339-344.
- 35.- Vessey M.P., Lawless M.,(1983); Neoplasia of the cervix uteri and contraception: A possible adverse effect of the pill; Lancet, 930-934.

- 36.- Negrini P.B., Schiffman H.M., Kurman J.R., Barnes W., Lannom L., y Lancaster D.W., (1990); Oral Contraceptive Use, Human Papillomavirus Infection, and Risk of early Cytological Abnormalities of the Cervix; *Cancer Res.*, 50:4670-4675.
- 37.- Boyce J.G., Lu T., Nelson J.H., et.al., (1972); Cervical Carcinoma and oral contraception. *Obstet. Gynecol.* 40:139-146.
- 38.- Zur Hausen H., (1982); Human Genital Cancer: Synergism between two virus infections or synergism between a virus infection and initiation events; *Lancet*, 18:1370-1372.
- 39.- Rapp F., Jenkin J., (1981); Genital Cancer and Viruses; *Gynecol. Oncol.*, 12:525-541.
- 40.- Kessler I., (1981); Etiological Concepts in Cervical Carcinogenesis; *Gynecol. Oncol.*, 12:7-23.
- 41.- Rapp F., and Reed L.C., (1977); The viral etiology of cancer: A realistic approach; *Cancer* 40:419-429.
- 42.- Meisels A., Morin C., (1981); Human Papillomavirus and Cancer of the Uterine Cervix; *Gynecol. Oncol.*, 12:111-123.
- 43.- Grubb S.G., (1986); Human Papillomavirus and cervical neoplasia: Epidemiological considerations; *Int. J. Epidemiology* 15:1-7.
- 44.- Naib Z.M., (1966); Exfoliate Cytology of Viral Cervico-Vaginitis; *Acta Cytol.* 10:126-130.

- 45.- Reid R., Stanhope R., Herschman R.B., Booth E., Smith P.J., (1982); Genital Warts and Cervical Cancer: Evidence of an Association between subclinical papillomavirus infection and Cervical Malignancy; Cancer, 50:377-387.
- 46.- Shope R.E., y Hurst E.W., (1989); En: Galloway A.D., y McDougall K.J.; Human papillomaviruses and Carcinomas; Adv. In Virus Res., American Press Inc. ;37:125-171.
- 47.- Olson C., y Cook R.H.,(1989); En: Galloway D.A. y McDougall J.K.; Human Papillomaviruses and Carcinomas; Advances in Virus Res., American Press Inc.;37:125-171.
- 48.- Reeves W., Rawls W., Brinton L.,(1989); Epidemiology of Genital papillomavirus and Cervical cancer; Reviews of Infections Diseases, 3:426-439.
- 49.- Zur Hausen, H., (1989); Papillomaviruses as carcinomaviruses. En: Klein G., ed. Advances in Viral Oncology. New York; Raven Press; 8:1-21.
- 50.- Faras J.A., Krzyzek A.R., Ostrow S.R., Watts L.S., Smith M.D. y Pass F.,(1980); Genetic Variation among papillomaviruses; Annals New York academy of sciences; 60-77.
- 51.- Pfister, H., Gissmann L., y Zur Hausen H.,(1977); Partial Characterization of the proteins of human papilloma viruses (HPV) 1-3; Virology 83:131-137.
- 52.- Pfister H., (1984); Biology and Biochemistry of papillomaviruses; Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. 99:112-125.

- 53.- Giri I., Danos O.,(1986); Papillomavirus genomes: from sequence data to biological properties. Trends in Genetics. 2:227-232.
- 54.- Gariglio P., y Carrancá G.A.,(1990); Papillomavirus humanos y cáncer cérvico uterino; Adol. Microbiol. Enf. Infecc. 8(5):45-58.
- 55.- Morin C., Braun L., Casas-Cordero M., Shah K.V., Roy M., Fortier M., Miesels A.,(1981); Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesions by peroxidase-antiperoxidase technique; JNCI. 66:531-542.
- 56.- Cripe T.P., Haugen T.H., Turk J.P., Tabata F., Schmid P.G., Dürst M., Gissmann L., Turek L.P.,(1987); Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte dependent enhancer, and by viral E2 trans-activador and repressor gene products implication for cervical carcinogenesis; EMBO J., 6:3745-3760.
- 57.- Bernard B.A., Bailly C., Darmon M., Thierry F., Yaniv M.,(1990); The intact HPV 18-E2 gene product is a transcriptional repressor of the homologous E6 promoter in human keratinocytes; J. Virol. in press.
- 58.- Wu T.C., Mounts P.,(1988); Transcriptional regulatory elements in the non coding region of human papillomavirus type 6; J. Virol., 62:4722-4726.
- 59.- Thierry F., García-Carrancá A., Yaniv M.,(1987); Elements that control the transcription of genital human papillomavirus type 18; Cancer Cells 5:23-30.
- 60.- Zur Hausen H.,(1985); Genital Papillomavirus Infections; Prog. Med. Virol., 32:15-21.

- 61.- Wilczynski, P.S., Bergen, S., Walker J., Liao, S., Pearlman, F.L.,(1988); Human Papillomavirus and Cervical Cancer: Analysis of histopathologic features associated with different viral types; Human Pathol., 19:697-704.
- 62.- Broker T.R., Botchan M.,(1986); Papillomaviruses: retrospectives and prospectives; Cancer Cells, 4:17-25.
- 63.- Dürst M., Kleinheinz A., Hotz M., Gissmann L.,(1985); The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumors; J. Gen. Virol., 66:1515-1525.
- 64.- Dürst M., Schwarz E., Gissmann L.,(1989); Integration and Persistence of Human Papillomavirus DNA in genital Tumors. En: Banbury Report 21; Viral etiology of Cervical Cancer (R.Feto, Howley P.M.,eds.); Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; 273.
- 65.- Dürst M., Croce C.M., Gissmann L., Scharaz E., Huebner K., (1987); Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:1070-1082.
- 66.- Campo M.S.,(1988); Viral and Cellular Oncogenes in Papillomavirus-associated cancers; Br. J., Cancer, 58(Suppl. IX):30-35.
- 67.- Gariglio P., Ocadiz R., Saucedo R.,(1987); Human Papillomavirus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma; Cancer Cells, 5:343-348.
- 68.- Ocadiz R., Saucedo R., Cruz M., Graef A., Gariglio P.,(1987); High correlation between molecular alterations of the c-myc oncogene and carcinoma of the uterine cervix. Cancer Res., 47:4173-4178.

- 69.- Schreier A., Gruber J., (1987); Transformation mechanisms of papillomavirus; JNCI., 78:779-786.
- 70.- Zur Hausen H., (1987); Papillomavirus in Human Cancer; Cancer, 59:1692-1699.
- 71.- Zur Hausen H., (1986); Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression; Lancet 2:489-495.
- 72.- Zur Hausen H., (1989); Papillomaviruses in anogenital cancer as model to understand the role of viruses in human cancers; Cancer Res., 49:4677-4681.
- 73.- De Villiers E.M., Gissmann L., y Zur Hausen H., (1981); Molecular Cloning of viral DNA from human genital warts; J. Virol., 40:932-937.
- 74.- Gissmann L., Diehl V., Schultz-Coulon J., y Zur Hausen H., (1982); Molecular Cloning and Characterization of Human Papilloma Virus DNA derived from a Laryngeal Papilloma; J. Virol., 44:393-400.
- 75.- Dürst M., Gissmann L., Ikenberg H., y Zur Hausen H., (1983); A Papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions; Proc. Natl. Acad. Sci., USA; 80:3812-3815.
- 76.- Borshart M., Gissmann L., Ikenberg H., Kleinheinz A., Scheurien W., y Zur Hausen H., (1984); A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer; EMBO J., 3:1151-1157.

- 77.- Lorincz A.T., Lancaster W.D., y Temple G.F.,(1986); Cloning and Characterization of the DNA of a new Human Papillomavirus from a Woman with dysplasia of the Uterine Cervix; J. Virol., 58:225-229.
- 78.- Beaudenon S., Kremsdorf D., Croisse S.J., Wain-Hobson S.,Orth G., (1986); A novel type of Human Papillomavirus Associated with Genital Neoplasias; Nature 321:246-249.
- 79.- Lorincz A.T.,Quinn P.A.,Lancaster W.D.,Temple G.F.,(1987); A New Type of Papillomavirus Associated with Cancer of the Uterine Cervix; Virology, 159:187-190.
- 80.- Shimoda K.,Lorincz A.T.,Temple G.F., y Lancaster W.D.,(1988); J. Gen. Virol., 69:2925-2929.
- 81.- Ferency M.,Braun L.,Shah K.,(1981); Human Papillomavirus (HPV) in Condylomatous Lesions of Cervix. A Comparative Ultrastructural and Immunohistochemical Study; Amer. J. Surg. Pathol., 5:661-670.
- 82.- Gupta J., Gupta P.,Rosensheim N.,Shah K.,(1987); Detection of Human Papillomavirus in Cervical Smear. A Comparison of *in situ* Hybridizations. Immunocytochemistry and Cytopathology; Acta Cytol., 31:367-395.
- 83.- Kulski J.K., y Norvall M.,(1985); Nucleic acid Probes in Diagnosis of Viral Diseases of Man; Arch. Virol., 83:3-15.
- 84.- Lorincz A.T.,(1987); Detection of Human Papillomavirus Infection by Nucleic Acid Hybridization; Obstet. Gynecol. Clin. Nort. Amer., 14(2):451-469.

- 85.- Lancaster W.D., y Norrild B., (1989); Diagnosis of HPV by DNA Hybridization Techniques; En: Human Papillomavirus and Cervical Cancer; International Agency for Research on Cancer; 94:87-103.
- 86.- Cluffo G.,(1907); Innesto Positivo con Filtrato di Verruca Vulgare; G. Ital. Mal. Veberecl., 48:12-18.
- 87.- Gissmann A.D., Pfister H., Zur Hausen H.,(1977); Human Papillomavirus (HPV): Characterization of Four Different Isolates; Virology, 76:569-580.
- 88.- Reid R., Greenberg M., Jenson B., Husain M., Willatt J., Daoud Y., Temple G., Stanhope C.R., Sherman A.I., Phibbs G.D., y Lorincz A.T.,(1987); Sexually Transmitted Papillomaviral Infections. I. The Anatomic distribution and Pathologic grade of Neoplastic Lesions Associated with Different Viral Types; Am. J. Obstet. Gynecol., 156:212-222.
- 89.- Galloway A.D., y McDougall J.K.,(1989); Human Papillomaviruses and Carcinomas; Advances in Virus Res., 37:125-171.
- 90.- Gissmann L., Wolnik L., Ikenberg H., Koldovsky U., Schnürch G., y Zur Hausen H.,(1983); Human Papillomavirus Types 6 and 11 DNA Sequences in Genital and Laryngeal Papillomas and Some Cervical Cancers; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:560-563.
- 91.- Lorincz A.T., Temple G.F., Kurman R.J., Jenson A.B., Lancaster W.D.,(1987); Oncogenic Association of specific Human Papillomavirus Types with Cervical Neoplasia; JNCI, 79:671-677.

- 92.- Acs J., Hildesheim A., Reeves W.C., Brenes M., Brinton L., Lavery C., Dela Guardia M.E., Godoy J., y Rawls W.E., (1989); Regional Distribution of Human Papillomavirus DNA and other Risk factors for Invasive Cervical Cancer in Panama; *Cancer Res.*, 49:5725-5729.
- 93.- González-Garay M., Avilés L., Barrera-Saldaña H., Gariglio P., (1989); Characterization of HPV 16 and 18 in Uterine Cervix Carcinomas from Two Different Mexican Populations., *J. Cell. Biochem.*, 13C:167-193.
- 94.- Reeves W.C., Brinton L.A., García M., Brenes M.M., Herrero R., Galtán E., Tenorio F., Britton R.C., y Rawls W.E., (1989); Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer in Latin America; *The New England J. Med.*, 22(320):1437-1441.
- 95.- Devesa S.S., Young J.L., Brinton L.A., y Fraumeni J.F., (1989); Recent Trends in Cervix Uteri Cancer; *Cancer*, 64:2184-2190.
- 96.- Pater M.M., Denne J., Hogan G., Ghatage P., y Pater A., (1986); Human Papillomavirus Types 16 and 18 sequences in Early Cervical Neoplasia; *Virology* 155:13-18.

APENDICE

REACTIVOS

Acetato de amonio	(BAKER)
Acetato de sodio	(BAKER)
Acido Bórico	(SIGMA)
Acido Clorhídrico	(BAKER)
Agarosa	(BIO-RAD)
Agarosa de Bajo punto de fusión	(BIO-RAD)
Alcohol isoamílico	(BAKER)
Amortiguadores 10X (E4,E5,E6,E9)	(AMERSHAM)
Azida de sodio	(SIGMA)
Bacto extracto de levadura	(BIOXON)
Bromuro de etílico	(SIGMA)
Brij 58	(SIGMA)
Buffer para calibración de potenciómetro pH 6.840 y 7.384	(ILAB)
Citrato de sodio	(BAKER)
Cloramfenicol	(SIGMA)
Cloroformo	(BAKER)
Cloruro de Potasio	(BAKER)
Cloruro de sodio	(BAKER)
Dextran sulfato	(SIGMA)
Deoxicidina 5' (alfa-P ³²) trifosfato	(AMERSHAM)
Deoxicolato de sodio	(SIGMA)
Diethylpirocarbonato	(SIGMA)
Dodecil sulfato de sodio	(MERCK)

EDTA	(BAKER)
Enzimas de restricción Xba-I, Pst-I, BamHI, Eco-R1 y HindIII	(AMERSHAM)
Esperma de salmón Tipo III	(SIGMA)
Etanol absoluto	(BAKER)
Fenol	(SIGMA)
Formamida	(SIGMA)
Fosfato de potasio	(BAKER)
Fosfato de sodio	(BAKER)
Hidróxido de sodio	(MERCK)
Kit "Nick Translation" code N.5000	(AMERSHAM)
Leche sveltes	(NESTLE)
Lisozima	(SIGMA)
Marcador de Peso Molecular (Bacteriófago λ)	(SIGMA)
Papel Whatman 3 MM	(BAKER)
Proteinasa K	(MERCK)
Peptona de Caseína	(BIOXON)
RNAsa	(SIGMA)
Sacarosa	(SIGMA)
Tricloroacetato de sodio	(BAKER)
Trizma base	(SIGMA)

EQUIPO

Baño maría sin agitación (BMT-8)	(MAPSA)
Baño maría con agitación (Mod. 3575)	(LAB-LINE)
Cámara para Dot-Blot (Bio-Dot, 84BR)	(BIO-RAD)
Centrífuga clínica (GLC-2, rotor HL-4)	(SORVALL)
Centrífuga refrigerada (RC5B, rotor SS34)	(SORVALL)
Congelador a -20°C (ULT 385)	(RHEEM)
Congelador a -70°C (ULT 985)	(RHEEM)
Densitómetro (DCD 16)	(GELMAN)
Espectrofotómetro (PM2DL)	(ZEIZZ)
Fuente de Poder (200/2.0)	(BIO-RAD)
Horno con vacío (3608)	(LAB-LINE)
Microcentrífuga (Microfuge 12)	(BECKMAN)
Micropipetas (1000 µl, 200 µl, 100 µl, 20 µl)	(GILSON)
Pantalla intensificadora (8X10)	(CRONEX)
Papel Nylon (Zeta-Probe)	(BIO-RAD)
Película de rayos X (8X10)	(KODAK)
Potenciometro (Mod. 3575)	(METROHM)
Transiluminador (2011 Macrouve)	(LKB)
Vortex (PC351)	(VORTEX-GENIE)