



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

03072

11  
28

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES  
Y DE POSGRADO DEL  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

DETECCION Y TIPIFICACION DE HPV, EN LAS  
DIFERENTES ETAPAS DEL CANCER CERVICO-UTERINO  
(CaCU), MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA  
POLIMERASA (PCR)

FALLA DE ORIGEN

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

MAESTRIA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

VIOLETA IBARRA GONZALEZ

CUERNAVACA, MÓRELOS

1995



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.

El presente trabajo fue desarrollado en el Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas del Instituto Nacional de Salud Pública. Bajo la dirección del Dr. Patricio Gariglio V.

### **Jurado de Tesis:**

Presidente: Dr. Carlos Federico Arias Ortiz  
Secretario: Dr. Enrique Merino Pérez  
Vocal: Dr. Patricio Gariglio Vidal  
Suplente: Dr. Miguel Angel Cevallos Gao  
Suplente: Dra. Alejandra Vázquez Ramos.

La realización de los estudios de maestría y del presente trabajo recibieron el apoyo económico por parte de **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** y el Sistema de Becas de Intercambio Académico: **UABC-UNAM**.

| INDICE   | Página |
|--|--------|
| RESUMEN  |        |
| 1. INTRODUCCION  | 1      |
| 1.1. El cáncer cérvico uterino (CaCU) como problema de salud pública                                       | 1      |
| 1.2. Papilomavirus humano (HPV) y CaCU   | 2      |
| 1.2.1. Características moleculares de los HPVs   | 2      |
| 1.2.2. Los HPVs y su relación con el CaCU  | 2      |
| 1.2.3. Métodos de detección de HPV   | 5      |
| 1.3. Oncogénos y antioncogenos en CaCU   | 6      |
| 1.4. El estado inmunológico del hospedero  | 7      |
| 1.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)   | 8      |
| 2. OBJETIVOS   | 11     |
| 2.1. Objetivo general  | 11     |
| 2.2. Objetivos específicos   | 11     |
| 3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL   | 12     |
| 4. MATERIAL Y METODOS  | 13     |
| 4.1. Muestras biológicas   | 13     |
| 4.1.1. Biopsias  | 13     |
| 4.1.2. Raspados cervicales   | 13     |
| 4.2. Líneas celulares y plásmidos  | 14     |
| 4.3. Tratamiento de muestras biológicas para la obtención de DNA   | 14     |
| 4.3.1. Biopsias  | 14     |
| 4.3.2. Raspados cervicales   | 14     |
| 4.3.2.1. Ebullición en agua  | 15     |
| 4.3.2.2. Digestión con Buffer K  | 15     |
| 4.3.2.3. Extracción fenólica   | 16     |
| 4.3.2.4. Separación de DNA por medio de Chelex-100   | 16     |
| 4.4. Detección y tipificación de los HPVs mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) | 17     |
| 4.4.1. Detección   | 17     |
| 4.4.2. Tipificación  | 18     |

|   |    |
|---|----|
| 5. RESULTADOS Y DISCUSION   | 22 |
| 5.1. Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)    | 22 |
| 5.1.1. Concentración óptima de DNA blanco                               | 22 |
| 5.1.2. Enzima Taq DNA Polimerasa y número de ciclos                     | 22 |
| 5.1.3. Efecto de la concentración de Magnesio                           | 25 |
| 5.1.4. Empleo de la técnica estandarizada                               | 25 |
| 5.2. Detección y tipificación de HPV en muestras de biopsias            | 28 |
| 5.3. Detección y tipificación de HPV en muestras de raspados cervicales | 38 |
| 5.4. Inhibición en la reacción de PCR                                   | 50 |
| 6. CONCLUSIONES   | 52 |
| 7. BIBLIOGRAFIA   | 54 |

## RESUMEN

El objetivo principal del estudio realizado en el presente trabajo fue la detección y tipificación del virus del papiloma humano (HPV), en las diferentes etapas del cáncer cervico-uterino (CaCU), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La tipificación se realizó para los tipos 16 y 18 de HPV clasificados como de alto riesgo para desarrollar cáncer. Se analizaron muestras biológicas a partir de biopsias (B) y raspados cervicales (RC) con lesión cervical, así como también controles negativos para el caso de RC, provenientes de mujeres sin lesión cervical (citología negativa para HPV).

En la primera etapa de este trabajo, se estandarizó la técnica de PCR lográndose las condiciones óptimas para la reacción, donde se encontró que el HPV es posible detectarse a partir de 2 picogramos de DNA de plásmido pHPV16 (control), y con aproximadamente 10 ng de DNA de células HeLa (control).

En una segunda etapa se procedió a aplicar la técnica para la detección de secuencias de DNA de HPV en muestras problemas de biopsias y raspados cervicales.

En el caso de las biopsias, un total de 58 muestras fueron estudiadas, detectándose la presencia de dichas secuencias en 40 de ellas. A 19 de los casos positivos, se les determinó el tipo de HPV presente, con base a los fragmentos de restricción esperados (pb) entre los distintos HPV's encontrándose exclusivamente el tipo 16.

Respecto a los análisis de raspados cervicales (108 muestras en total), fue necesario establecer la metodología para la obtención de DNA como un paso previo de tratamiento a la reacción de PCR. De las diferentes alternativas de extracción evaluadas, el tratamiento de las muestras con fenol proporcionó los mejores resultados. Posterior al proceso de extracción, se procedió a determinar la presencia del papilomavirus donde se presentaron problemas de inhibición sobre la reacción de amplificación en el 28% (30/108) de las muestras analizadas. Por lo que estas últimas fueron descartadas del estudio.

Del 72% restante, 45 de las muestras fueron positivas para HPV, de las cuales se seleccionaron 26 para el análisis de tipificación donde se presentó el tipo de HPV-16 con mayor frecuencia. Sin embargo, en un número reducido de los casos positivos del tipo 16 (7 muestras) también se detectó el tipo de HPV-18.

La detección de secuencias nucleotídicas del HPV tanto en muestra de biopsia y raspados cervical, permitió estudiar la infección por el virus HPV, involucrado en el desarrollo del CaCU. La identificación del genoma viral a tiempos tempranos de la infección puede conducir a un diagnóstico y pronóstico clínico acertado.



## 1. INTRODUCCION

### 1.1. El cáncer cérvico-uterino, como un problema de salud pública

A nivel mundial, se estima que el cáncer cérvico uterino (CaCU) ocupa el segundo lugar como causa más frecuente de mortalidad en la población femenina. Según la Organización Mundial para la Salud (OMS), cada año se registran al menos 450,000 casos de los cuales cerca del 45 % fallece [1,2]. La aplicación de campañas masivas de detección temprana del CaCU, aunado a los avances terapéuticos, han permitido, en las últimas dos décadas, una disminución notable en la incidencia y mortalidad de este padecimiento en los países desarrollados. En México el carcinoma cérvico uterino es la enfermedad neoplásica más frecuente, con aproximadamente un 30 % de todos los tumores malignos de la mujer, lo cual constituye un serio problema de salud pública. El cáncer cérvico uterino es una enfermedad que se desarrolla a lo largo de estadios múltiples, que permanecen sin modificación aparente durante tiempos largos y sólo un pequeño porcentaje progresa hasta cáncer invasor. Las lesiones preinvasoras e invasoras del cuello uterino se presentan como una serie de cambios que empiezan generalmente como una neoplasia intraepitelial cervical (NIC), es decir, empiezan con una lesión bien diferenciada, la NIC I o displasia leve; pasan por una fase menos diferenciada, la NIC II o displasia moderada, luego una lesión intraepitelial indiferenciada, la NIC III que comprende la displasia severa y el carcinoma *in situ*, para finalmente terminar en el carcinoma invasor [1,3,4]. La mayoría de las lesiones preinvasoras revierten o permanecen sin avance durante muchos años y sólo un pequeño porcentaje progresa hasta cáncer invasor. El tiempo usual de evolución de las lesiones es muy largo (generalmente entre 10 y 20 años); se observa que la edad promedio de una paciente con lesión premaligna es de 25 años, en tanto que las mujeres que presentan cáncer invasor tienen un promedio de 45 años [5-15].

Estudios clínicos y epidemiológicos sugieren que éste cáncer, está relacionado con compuestos químicos, factores medioambientales, tabaquismo y hábitos sexuales. En el origen y desarrollo de este proceso neoplásico parecen estar involucrados: 1) Los virus del papiloma humano, 2) algunas alteraciones en oncogénes (c-myc, ras), 3) antioncogénes (p53, Rb), y 4) el estado inmunológico del huésped [9, 16-18].

## 1.2. Papilomavirus humano y CaCU

### 1.2.1. Características moleculares de los papilomavirus

El virus del papiloma humano (HPV) se encuentra dentro de la familia de los *Papovaviridae*; estos son virus de DNA, circular de doble cadena de un tamaño de entre 7 y 8 Kb. Su genoma se encuentra compactado con histonas, formando nucleosomas y encapsidado en viriones icosaédricos con 72 capsómeros. La información genética se encuentra localizada en una sola cadena [1,3,6]. El genoma del virus está dividido en una región temprana de aproximadamente 4.5 Kb, la cual es necesaria para la transformación, y comprende ocho tipos de genes (E1-E8). La región tardía comprende dos genes (L1-L2) que codifican para las proteínas de la cápside (alrededor de 2.5 Kb). El genoma viral posee además una región larga de control (LCR), no codificadora (alrededor de 1 Kb) que contiene los elementos que regulan la replicación y transcripción [Figura 1] [19-24]. Aunque la estructura del virus es relativamente simple, su genoma es altamente complejo con respecto a su expresión; algunas de las funciones más importantes que se le atribuyen a cada uno de sus genes se resumen en la Tabla 1. Se conocen alrededor de 65 tipos diferentes de HPVs que infectan diferentes sitios en el humano; alrededor de 35 tipos de HPV infectan la piel (HPV-1, 2, 4, 7, 10, etc.), cerca de 20 infectan el tracto genital (HPV-6, 11, 16, 18, 31, etc.) y dos tipos se encuentran exclusivamente en la cavidad oral (HPV-13 y 32) [14-16].

### 1.2.2. Papilomavirus humano y su relación con el CaCU

Actualmente se piensa que la infección del tracto anogenital por HPV es una enfermedad transmitida sexualmente, relacionada con el desarrollo de cáncer. Diversos estudios han señalado que existe una fuerte asociación entre la infección por los tipos de alto riesgo y las características de las lesiones epiteliales que inducen en el cervix uterino. También hay evidencia de que los HPVs están involucrados en la transformación celular, aunque un elevado porcentaje de mujeres acarrean infecciones silenciosas de los tipos oncogénicos, especialmente el tipo 16

(HPV-16) y 18 (HPV-18). Se ha demostrado que no todos los pacientes infectados con HPV necesariamente desarrollan un carcinoma [12-15, 25].

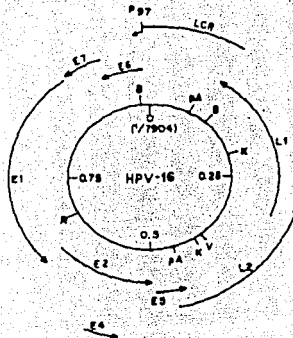


Figura 1.- MAPA GENETICO DEL PAPILOMAVIRUS TIPO 16 (HPV-16). El genoma de los papilomavirus es de DNA de doble cadena de aproximadamente 8 Kb y se ha dividido en tres regiones: la temprana (E), la tardía (L) y la región larga de control (LCR). En este diagrama se muestran además los sitios de poliadenuilación (pA) y algunos de restricción: B, Bam HI; R, Eco RI; K, Kpn I; V, Eco RV. P97, promotor.

Tabla 1. GENES Y PROTEINAS DEL HPV-16

| GEN | Función       | Nucleótido |        | peso Molecular (proteína)                   |
|-----|---------------|------------|--------|---|
|     |               | Primero    | Ultimo |   |
| E6  | Oncogén       | 110        | 556    | 11 KD <sup>7,8</sup> , 18 KD <sup>23</sup>  |
| E7  | Oncogén       | 585        | 855    | 15 KD <sup>7,20</sup> , 20 KD <sup>21</sup> |
| E1  | Replicación   | 1240       | 2811   | 70 KD (HPV-18) <sup>7,8</sup>               |
| E2  | Transcripción | 2725       | 3849   | 50 KD <sup>2,21</sup>                       |
| E4  | Replicación?  | 3399       | 3617   | 10 KD <sup>8,20</sup>                       |
| E5  | Oncogén?      | 3869       | 4096   | 7 KD <sup>22,21</sup>                       |
| L2  | Cápside menor | 4139       | 5654   | 57 KD <sup>10</sup>                         |
| L1  | Cápside mayor | 5692       | 7152   | 43 KD <sup>10</sup>                         |

Referencias: <sup>7</sup>Seedorf y cols., 1987; <sup>8</sup>Sousa y cols., 1990; <sup>10</sup>Shah y cols., 1992; <sup>20</sup>Smotkin y cols., 1986; <sup>21</sup>Chou-chi y cols., 1988; <sup>22</sup>Dillner y cols., 1990; <sup>23</sup>Androphy y cols., 1987; <sup>24</sup>Leechanachau y cols., 1992; <sup>26</sup>Kanda y cols., 1992.

Los HPV de alto riesgo se han detectado hasta en un 80 % de pacientes con carcinoma cervical [26-33]. Estudios previos en nuestro laboratorio, Gariglio y col., [18] mostraron la presencia del HPV-16 en un 31% de los tumores de CaCU (Southern blot), lo que despertó gran interés por estudiar este virus en muestras donde pudiera realizarse un pronóstico del virus en etapas tempranas a desarrollar el cáncer cervico-uterino. Los HPV más frecuentemente asociados con lesiones del tejido cervico-uterino son los tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35. En base a su asociación con tumores malignos, estos HPV se pueden clasificar en grupos de bajo riesgo (HPV-6 y 11), intermedio (HPV-31, 33, 35) o alto riesgo (HPV-16 y 18) [3, 14, 16].

El cáncer invasor del cervix está precedido de una serie progresiva de anomalías (lesiones precursoras) determinadas neoplasia intraepitelial cervical (NICs) grados I, II y III. Por ejemplo, el HPV-16 se clonó originalmente de un cáncer cervical invasor y posteriormente se ha encontrado en todos los casos de NICs, pero más frecuentemente en NIC III, en tumores invasores del cervix y en metástasis. Los virus de papiloma humano de los tipos 16 y 18 en CaCU, se les ha clasificado a ambos como virus de alto riesgo, sin embargo, su comportamiento es bastante diferente. La frecuencia de HPV-18 en lesiones tempranas es baja al compararla con HPV-16 en dicha lesión. El nivel de HPV-18 en cáncer invasor es alto en relación con otros tipos virales. Esto sugiere que las lesiones asociadas al HPV-18 progresan rápidamente o que los niveles de DNA viral son muy bajos en lesiones tempranas. El HPV-18 se asocia con cáncer cervical en mujeres más jóvenes, con una alta proporción de metástasis y con tumores de grados más altos. Además se ha observado que el embarazo puede predisponer a las mujeres a infecciones activas por HPV, factor de gran importancia ya que existe la posibilidad de transmisión del virus de la madre al hijo [10, 11]. Existen otros factores genéticos que intervienen en cáncer cervico-uterino ya que un 20-30% de la población sexualmente activa lleva HPV de alto riesgo en sus genitales y sólo una pequeña fracción de los individuos infectados desarrolla cáncer después de un largo periodo de latencia (10-20 años). En base a lo anterior, es importante desarrollar una técnica adecuada para la identificación de HPV a tiempos tempranos de la infección y poder proporcionar un diagnóstico y pronóstico clínico acertado.

### 1.2.3. Métodos de detección de HPV

El diagnóstico de HPV se ha realizado usando una amplia variedad de procedimientos basados principalmente en el análisis citológico y posteriormente en el de ácidos nucleicos por diversas técnicas de hibridación, por ejemplo, Southern, Dot blot, hibridación *In situ*, etc. y recientemente por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) [34-54]. El principal método citológico utilizado en la actualidad ha sido el del "Papanicolaou" (Pap). El Pap es un buen método para detectar alteraciones de citología cérvico vaginal a nivel patológico pero no identifica confiablemente las manifestaciones tempranas de los HPVs. Sin embargo existe la desventaja de su imprecisión, ya que en ocasiones aporta falsos positivos y lo que es peor, falsos negativos. Los métodos más modernos que utilizan tecnología de DNA recombinante son más sensibles y específicos; las técnicas de hibridación que identifican secuencias de DNA o RNA de HPV, son caras y requieren de un tiempo largo para su desarrollo. Una de las pruebas que se utiliza comercialmente es la de Vira-Pap (Life technologies, Inc.) la cual utiliza un método denominado análisis en mancha puntiforme que permite estudiar múltiples tipos de HPV (6, 11, 16, 18, 31, 33 y 35) es decir, aquellos que infectan con mayor frecuencia a los genitales; una de las limitaciones del ViraPap es que tiene baja sensibilidad para cantidades menores de DNA [41-52]. El método más práctico para la identificación de nuevos tipos o subtipos de HPV ha sido la hibridación tipo Southern y, actualmente, la PCR.

En PCR se han utilizado diferentes oligonucleótidos diseñados a partir de la región temprana (E1-E6) o tardía (L1) del genoma del HPV; se han usado "primers" tipo específico, generales o universales para la identificación y tipificación de los diversos papilomavirus. El PCR es esencialmente una reacción enzimática y requiere de condiciones cuidadosamente controladas para obtener una amplificación eficiente del producto deseado (ver más adelante)

La detección de secuencias de DNA de HPV por PCR debe complementar el estudio citológico ya que representa un método muy confiable, por tratarse de un evento molecular. Dicha detección es extremadamente sensible (unas cuantas moléculas de DNA viral) y puede indicar además el tipo de papiloma. Se debe de tomar en cuenta que las lesiones cérvico-uterinas, diagnosticadas por la presencia de células

anormales en un frotis (Pap), aparecen sobre todo en mujeres jóvenes, mientras que el cáncer CaCU invasor es muy raro en tales mujeres.

La detección a una edad temprana conduce aun mejor pronostico y al ahorro de recursos empleados en tratar lesiones de cáncer invasor [51].

Mediante la hibridación *in situ*, varios grupos de trabajo han descubierto la presencia del DNA del HPV de alto riesgo en 5 a 30 % de mujeres con citología normal del cérvix (50,52,56). Otros investigadores reportaron, mediante el uso del PCR, una variación de 0 a 70 % en insidencia en mujeres clinicamente normales, justificado esto por factores geográficos, el uso de diferentes metodologías de detección y tipificación así como de oligonucleotidos utilizados [44, 47, 51]. Estos estudios sugieren que la relación etiológica entre infección con HPV's de alto riesgo y cáncer cervical no está claramente establecida, por lo que es necesario el estudio de los mecanismos moleculares que intervienen en el proceso tumorigénico así como también se necesita establecer la relación que existe entre el CaCU con la presencia de este virus, principalmente los de alto riesgo. Dichos mecanismos moleculares tienen que ser detectados conjuntamente y a tiempo para poder establecer un método de diagnóstico eficaz para combatir la enfermedad.

### 1.3. Oncogenes y antioncogenes en CaCU

El descubrimiento de los oncogénes y antioncogenes en la década pasada, ha aportado una gran cantidad de elementos que van permitiendo entender el desarrollo del cáncer a nivel molecular en sus múltiples etapas. Los oncogénes celulares son formas mutadas de genes normales (los proto-oncogenes). Una gran variedad de productos medioambientales, con los cuales estamos en contacto diariamente (asfalto, tabaco, radiaciones, etc.) son carcinogénicos. Estos productos alteran al DNA, lo cual puede llevar a una activación de los proto-oncogenes, transformándolos en oncogénes [15, 17, 34, 55, 56]. Entre las alteraciones importantes de los protooncogenes podemos citar: mutación, amplificación y rearreglo génico. De los protooncogenes más estudiados en la actualidad se encuentran los genes *myc* y *ras*. El proto-oncogén *c-myc* se encuentra generalmente amplificado (es decir, hay más de dos copias por célula) en tumores humanos y los genes *ras* (H-*ras*, K-*ras*) se

encuentran frecuentemente mutados en el codón 12 en muchos carcinomas [18, 55, 56].

En México se ha observado que en un alto porcentaje de tumores de diverso tipo (mamario, cervico-uterino, cerebral) hay alteraciones moleculares (amplificación y rearrreglo génico) de *myc* [15, 17, 18]. Otro tipo frecuente de alteración genética que ocurre durante el desarrollo de un tumor es la inactivación o pérdida de función de uno o más antioncogenes. Se piensa que estos genes juegan un papel regulatorio negativo en el control de la proliferación celular. Estudios epidemiológicos indican que el 50-60% de los cánceres humanos expresan la proteína antioncogénica p53 mutada, lo cual lleva a la conclusión de que mutaciones en el gen p53 son las alteraciones genéticas más frecuentemente encontradas en cáncer humano. Se ha demostrado que las oncoproteínas E6 y E7 de HPV forman complejos con las proteínas antioncogénicas p53 y pRb (retinoblastoma) respectivamente, inactivándolas.

Estas asociaciones se han observado con mayor afinidad cuando las proteínas virales provienen de HPVs de alto riesgo, lo cual sugiere que estos complejos son determinantes del potencial oncogénico de los diferentes tipos de HPV [6, 15, 19, 26]. Se ha sugerido que la inactivación de estos antioncogenes es muy importante en carcinogénesis cervical, y que la inactivación puede ocurrir ya sea a través de la asociación de p53 y pRb con las proteínas virales E6 y E7, respectivamente, en cáncer HPV positivo, o a través de mutaciones de los genes p53 y Rb en los casos de cáncer negativos para HPV.

#### **1.4. El estado inmunológico del hospedero**

La inmunidad celular desempeña un papel fundamental en la defensa contra la infección por HPV. El primer encuentro entre el virus y el sistema inmunológico ocurre en el epitelio, produciéndose una defensa natural inmediata del cuerpo ante el agente infeccioso. También la respuesta inmune celular, juega un papel importante en el reconocimiento inicial de las células neoplásicas, y en el control de su proliferación, lográndose una regresión en presencia de una buena respuesta inmunológica [6, 16]. Sin embargo, los papilomavirus no se han podido propagar en cultivos de células, por lo que ha sido difícil estudiar ciertos aspectos de su ciclo de

vida, así como generar reactivos apropiados para el estudio de serología tipo-específica y respuesta inmune celular [16, 23]. Sólo hasta hace pocos años, el uso de metodologías empleadas en Ingeniería Genética, han hecho posible aislar, clonar y expresar los genes de los HPVs más representativos, lográndose así obtener grandes cantidades de antígenos virales para ensayos inmunológicos. En la actualidad, distintos grupos de investigadores han realizado trabajos relacionados con la respuesta humoral [9, 19, 22, 26, 34], en los que se reportan anticuerpos contra prácticamente todos los antígenos del HPV-16 en sueros de pacientes con lesiones precancerosas y cancerosas del cérvix. Dejando en claro que los antígenos virales sí pueden ser detectados por el sistema inmune de un individuo infectado. Sin embargo, aún faltan estudios que permitan conocer cómo la inmunidad humoral modifica la evolución natural de la infección por papilomavirus. Los resultados de tales estudios podrían tener las bases necesarias para el diseño de métodos inmunológicos de diagnóstico y pronóstico del CaCU, así como también para lograr la inmunoterapia de tumores y el desarrollo de una posible vacuna [9].

### **1.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

Esta técnica (PCR) ha tenido gran impacto por su habilidad de detectar (mediante una reacción enzimática) cantidades tan pequeñas como picogramos de DNA. Para el diseño de oligonucleótidos se requiere conocer secuencias que flanqueen ambos extremos de un fragmento específico de DNA. Estos oligonucleótidos pueden ser específicos o consensos para alinearse a una secuencia blanco del DNA; una DNA polimerasa resistente a altas temperaturas usa esos oligonucleótidos como primers específicos para sintetizar DNA usando ambas cadenas de DNA como templado. La reacción se lleva a cabo durante ciclos consecutivos, cumpliendo los pasos de: desnaturalización (separación de las dos cadenas de DNA), hibridación de los primers a su secuencia complementaria y síntesis de las cadenas mediante la DNA polimerasa. Esto resulta en una producción exponencial de un fragmento específico del DNA blanco. El PCR permite la amplificación *in vitro* de secuencias de DNA por un factor de  $10^6$  o más en pocas horas y por lo tanto es potencialmente muy sensible [25, 27, 57], ver Diagrama 1.



# PCR

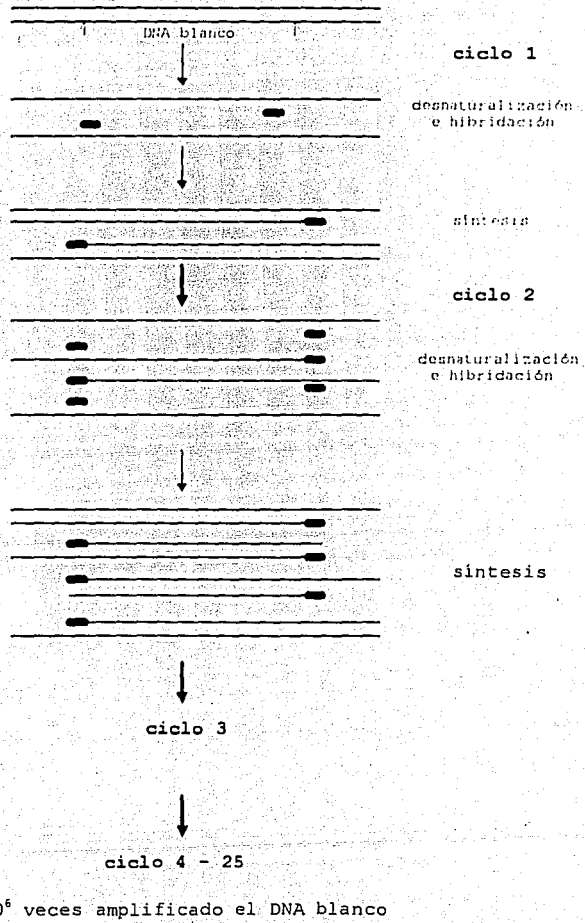


Diagrama 1. Amplificación del DNA por la reacción en cadena de la polimerasa

Teóricamente, en condiciones óptimas el nivel de amplificación del DNA en el PCR aumenta en forma exponencial por cada ciclo, sin embargo en la práctica, después de determinado número de ciclos, la amplificación se detiene gradualmente. Entra primero a una fase lineal y luego a una estacionaria, a la que se denomina fase de "meseta", esto se debe en principio a una pérdida gradual de la actividad enzimática (o de sustratos de la reacción) y a la insuficiencia para llevar a cabo la extensión del número masivo de complejos DNA blanco-oligonucleótidos, presentes en los ciclos que anteceden a este fenómeno. Esto puede evitarse si se aumenta el tiempo de extensión en los últimos ciclos

de la reacción de tal manera que se completen las cadenas de DNA y se obtengan los niveles máximos de amplificación. Los protocolos relacionados con PCR han evolucionado desde su introducción a la fecha, favoreciéndose no solo el aumento de la especificidad y sensibilidad de la reacción, sino también la eficiencia, el aumento en el tamaño de los fragmentos a amplificar y el incremento en la versatilidad de aplicaciones a nivel de diagnóstico y de investigación. Esto se ha logrado a través de la estandarización de parámetros críticos como tiempo, temperatura y número de ciclos de amplificación. A su vez, la estandarización de concentraciones de reactivos (oligonucleótidos, ion magnesio, DNA blanco, enzima y dNTPs) permite la disminución de inespecificidad de los oligonucleótidos, aumentando por consecuencia su fidelidad hacia el fragmento que se desea amplificar. También permite mejor control de falsos positivos. Es importante destacar que se deben incluir siempre testigos negativos en la reacción de PCR, para evitar problemas de contaminación [27, 28, 57].

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GENERAL**

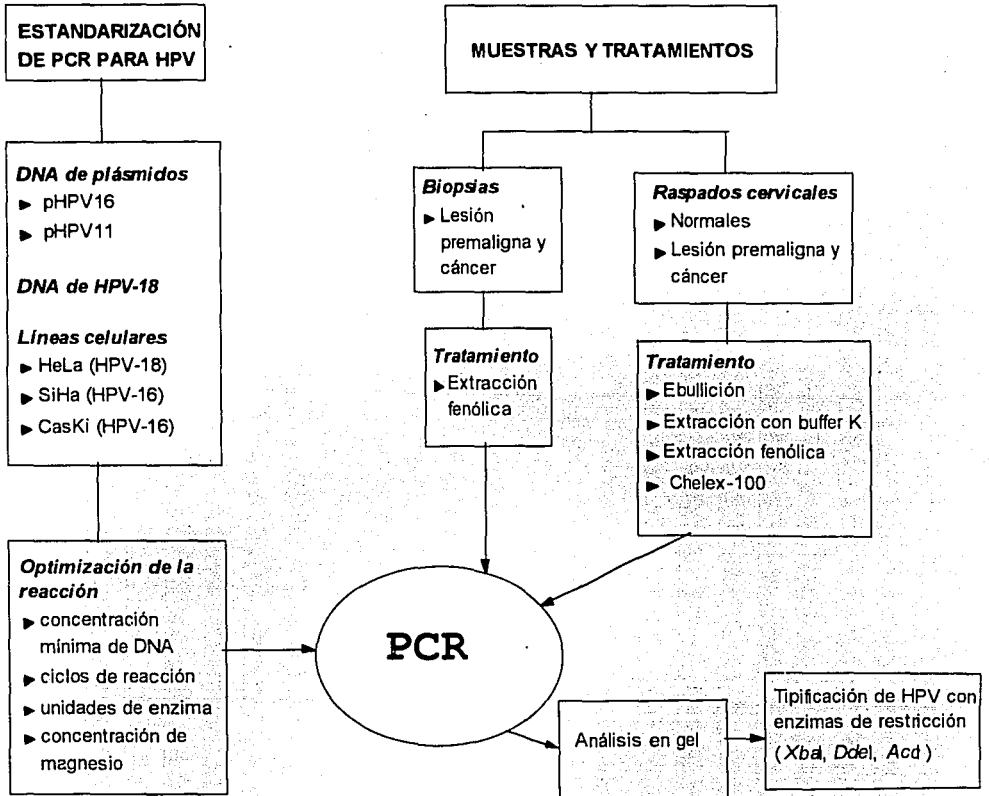
DESARROLLAR UN METODO DE PCR PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE SECUENCIAS DE DISTINTOS TIPOS DE HPV EN POBLACION CLINICAMENTE NORMAL Y EN LESIONES PRECANCEROSAS Y AVANZADAS DE CANCER CERVICO-UTERINO.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

2.2.1. DESARROLLO Y ESTANDARIZACION DE UN METODO DE PCR PARA LA DETECCION DE HPV INVOLUCRADOS EN LESIONES GENITALES.

2.2.2. MEDIANTE EL METODO DE PCR DETERMINAR LA PRESENCIA Y TIPO DE HPV EN LESIONES PRECANCEROSAS Y AVANZADAS DE CANCER CERVICO-UTERINO.

### 3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## **4. MATERIAL Y METODOS**

### **4.1. Muestras biológicas.**

Para llevar a cabo la detección y tipificación del virus del papiloma humano, se trabajaron con dos tipos de muestras biológicas: biopsias y raspados cervicales ambas provenientes de la Cd. de México.

#### *4.1.1. Biopsias (B).*

En este estudio se trabajó con 58 muestras de biopsias de las cuales 40 provenían del Hospital Militar y 18 de la Clínica 4 de Ginecología y Obstetricia "Castelazo Ayala". Dichas biopsias fueron obtenidas de mujeres que presentaban lesión cervical, desde una displasia hasta un cáncer avanzado.

#### *4.1.2. Raspados cervicales (RC).*

Para el estudio de PCR se seleccionaron al azar 108 muestras de raspados cervicales, de las cuales se desconocía si correspondía a casos (muestras con sospecha clínica-citológica de lesión cervical y comprobación por histopatología) o a controles (muestras sin sospecha clínica-citológica), para evitar el sesgo del observador (estudio de doble ciego).

Las muestras fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud Pública (I.N.S.P. de Cuernavaca, Mor.) donde se realizó un estudio a nivel epidemiológico, a partir del cual se seleccionaron 513 casos incidentes de neoplasia cervical con resultado de patología positiva, provenientes de 8 unidades hospitalarias de la ciudad de México (Hospital General y Hospital de la Mujer de la SSA, Gineco 3 "La Raza" y Gineco 4 del IMSS, Hospital "20 de Noviembre" del ISSSTE, Hospital Militar y dos privados; el Metropolitano y el de México). Para la obtención de controles negativos se colectaron 1007 muestras de mujeres, seleccionadas a través de una

muestra aleatoria de viviendas en las 16 delegaciones políticas de la Cd. de México (Datos proporcionados por el Dr. Eduardo Lazcano, del I.N.S.P).

#### **4.2. Líneas celulares y plásmidos.**

Las líneas celulares que se utilizaron como control positivo fueron HeLa, SiHa y CasKi derivadas de un cáncer cervicouterino invasor, las cuales contienen al papilomavirus humano integrado en su DNA genómico. HeLa presenta de 10 a 50 copias del HPV-18, SiHa de 1 a 2 copias del HPV-16 y CasKi aproximadamente 500 copias del HPV-16 por célula, respectivamente.

Los plásmidos utilizados fueron el pHPV11 y pHPV16 de aproximadamente 10,686 pb, derivados del plásmido pUC19 el cual tiene insertado el genoma del virus del papiloma humano en la región polylinker.

Adicionalmente también se trabajó con secuencias nucleotídicas de DNA del papilomavirus tipo 18. El tamaño del genoma de HPV es de 8000 pb aproximadamente.

#### **4.3. Tratamiento de las muestras.**

##### *4.3.1. Biopsias.*

El tratamiento de estas muestras fué realizado por el grupo de trabajo del Dr. Berumen (40 biopsias) y por el M. en C. Juan M. Alcocer del CISEI, I.N.S.P (18 biopsias), quienes nos proporcionaron el DNA ya extraído de las muestras para la detección y tipificación del HPV.

##### *4.3.2. Raspados cervicales.*

Se utilizaron diferentes metodologías para el tratamiento de éstas muestras, previas a la reacción de PCR. Las muestras de raspados cervicales se resuspendieron en buffer de PBS 1X (NaCl 0.14 M, KCl 2.6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 8 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 mM, a pH 7.4) y se almacenaron a -20 °C para su conservación.

#### 4.3.2.1. Extracción de DNA por "Ebullición en agua"

Es uno de los procedimientos más utilizados por su facilidad y comodidad para la preparación de muestras, previas a los ensayos de PCR. Este consiste en someter a un calentamiento entre 90 y 100 °C en baño de agua, en un periodo de 10 a 30 minutos, con la finalidad de romper las células y liberar el material genético. Esta metodología se aplicó primero a líneas celulares (HeLa, SiHa y CasKi) y posteriormente a muestras de raspados cervicales. Para ambos casos se tomaron volúmenes de 200 y 500 µl de muestra y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos. La pastilla se resuspendió en 200 µl de agua destilada siguiendo el tratamiento de ebullición en agua ya mencionado.

Al final del tratamiento, las muestras se centrifugan nuevamente (15.000 rpm por 5 minutos) y el sobrenadante se utiliza para los ensayos de PCR.

#### 4.3.2.2. Extracción de DNA por medio del "Buffer K"

El tratamiento de las muestras se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en PCR Protocols [37], y que a continuación se describe brevemente: Se toman 200 µl de muestra a tratar y se centrifuga a 3.000 rpm por 5 minutos, la pastilla se resuspende en 100 µl de Buffer K (KCl 50 mM, Tris-HCl pH 8.3 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, NP 40 y Tween 20 al 0.45 % y Proteinasa K 60 µg/ml). Posteriormente esta mezcla se incuba a 55 °C durante 1 hr y posteriormente a 95 °C durante 15 minutos, para inactivar la proteasa. Finalmente, y después de una etapa de centrifugación, el sobrenadante se recupera y utiliza en la reacción de PCR. Las muestras tratadas pueden ser almacenadas a -20 °C.

Este tratamiento se aplicó tanto a las muestras de líneas celulares como a los raspados cervicales.

**Líneas celulares:** Partiendo de cultivos celulares, las células se raspan y se transfieren a tubos eppendorf que contienen 200 µl de buffer PBS 1X. Después del conteo de células en la cámara de NewBauer, se procede a realizar las diluciones necesarias para obtener el número de células deseadas (20, 100, 1000 y 5000 células) en los ensayos de PCR, siguiendo con el tratamiento en buffer K antes descrito.

Raspados cervicales: Para este caso se tomaron 500  $\mu$ l de las muestras (resuspendidas en PBS 1X) y se pasaron a tubos eppendorf, se centrifugaron a 3,000 rpm por 5, se separa el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 100  $\mu$ l del Buffer K siguiendo con el protocolo antes descrito.

#### 4.3.2.3. "Extracción fenólica "

Con el propósito de remover sustancias que puedan interferir en la reacción de PCR, se procede a extraer DNA de las muestras a analizar mediante el método convencional propuesto en Current Protocols [58]. Se obtuvieron concentraciones de DNA entre 500 ng y 3  $\mu$ g, los cuales se diluyeron en agua destilada. Los ensayos de PCR se realizaron con 100 ng de DNA en el caso de muestras de biopsias, y de 500 ng a 1  $\mu$ g para las muestras de raspados cervicales. La concentración del DNA se determinó en un espectrofotómetro (BECKMAN DU 650 USA) a una longitud de onda de 260 nm.

#### 4.3.2.4. Separación del DNA por medio de "Chelex-100 "

También se purificó el DNA usando la resina Chelex 100 en el tratamiento de muestras de raspados cervicales, ya que se ha observado que incrementa la señal de amplificación por PCR partiendo de una pequeña cantidad de DNA liberado de las muestras. Esta resina de intercambio iónico protege al DNA, capturando gran cantidad de sustancias liberadas durante el rompimiento celular, las cuales pudieran interferir en la reacción de PCR. Este método provee una alternativa a tediosas purificaciones de DNA y permite mayor facilidad de manipulación de las muestras. La metodología utilizada para el tratamiento fue la propuesta por Sean Walsh y col., [59]. Se toman de 100 a 200  $\mu$ l de la muestra original de los RC y se colocan en un tubo eppendorf, se agrega la resina Chelex-100 al 5%, 2  $\mu$ l de proteinasa K 10 mg/ml y 7  $\mu$ l de ditiotreitól (DTT) 1 M. Esta mezcla se incuba a 56 °C durante un tiempo de 30 a 60 minutos. Posteriormente se somete a ebullición 10 minutos y se centrifuga a 10,000 rpm por 3 minutos. El sobrenadante se separa y se toman de 10 a 30  $\mu$ l para el ensayo de PCR.



#### **4.4. Detección y tipificación de HPVs mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).**

##### *4.4.1. Detección.*

Para determinar la presencia de secuencias de papilomavirus humano en las muestras estudiadas se realiza la reacción de PCR, utilizando los oligonucleótidos consenso diseñados por Yoshikawa y col., [35], contra la región tardía del gen L1 del papiloma (Fig. 2), que detecta hasta 9 tipos de papilomavirus genitales (HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52 y 58). El fragmento esperado, en la amplificación de PCR, es de 253 pb para los tipos 16 y 18, y de 244 pb para HPV 6 y 11. Se utilizaron controles negativos y positivos en cada ensayo de PCR, así como también un control interno sin DNA para monitorear la presencia de contaminantes de la reacción.

La reacción se realiza en un volumen final de 50  $\mu$ l, de la mezcla de reacción que contiene: Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, 200  $\mu$ M de cada uno de los desoxinucleótidos (dATP, dTTP, dGTP y dCTP), 200 ng de cada oligonucleótido y 2 U de Taq DNA polimerasa (GIBCO-BRL). Se adicionan 50  $\mu$ l de aceite mineral para evitar la evaporación de la mezcla. La reacción se lleva a cabo en un aparato termociclador de Perkin Elmer mod. 480, bajo las siguientes condiciones: 1 ciclo de 5 minutos a 94 °C para desnaturalización del DNA, y 40 ciclos de 90 °C, 1.5 minutos (desnaturalización), 48 °C, 30 segundos (hibridación) y 72 °C, 1.5 minutos (extensión), al finalizar los ciclos la reacción se mantiene a 72 °C durante 15 minutos adicionales. Al terminar la reacción, se toma 1/10 de la reacción para hacer una electroforesis 1 a 2 hr, en un gel de poliacrilamida al 6 % empleando como amortiguador TBE 1X (Trizma base 130 mM, ácido bórico 40 mM, Na<sub>2</sub> EDTA 2.8 mM), a 100 Volt. Los productos de amplificación se revelan por tinción con bromuro de etidio (1mg/ml). Para monitorear la calidad del DNA y como control positivo de la reacción de PCR se realiza una amplificación con oligonucleótidos para el gen de  $\beta$ -globina (Saiki y col., 1988 y Wilczynski y col., 1993) obteniendo un producto del tamaño esperado de 268 pb en todas las muestras trabajadas.

#### 4.4.2. Tipificación de papilomavirus.

La tipificación de los productos amplificados, utilizando los oligonucleótidos LIC1 y LIC2 se realizó en base a los polimorfismos en la longitud de los fragmentos obtenidos con diferentes enzimas de restricción (RFLPs), esperados (pb) entre los distintos HPVs, Tabla 2. Los productos de PCR, en los cuales se obtuvo amplificación, se procedieron a cortar con las enzimas de restricción (*XbaI*, *AccI* y *DdeI*), ya que el producto amplificado contiene sitios específicos en los cuales cortan estas enzimas.

Con este método de tipificación, se puede detectar la presencia de los papilomavirus de alto riesgo (tipos HPV 16 y 18) en el desarrollo del CaCU.

La digestión se llevo a cabo de la siguiente manera: se toman de 5 y 10  $\mu$ l del volumen final de la reacción de PCR sin purificar (entre 100 y 200 ng), se agregan 5 unidades de la enzima de restricción respectiva *XbaI*, *AccI* y *DdeI* (BioLabs) en un volumen final de de 20  $\mu$ l, y se incuba a 37 °C durante 24 hr. Es importante mencionar que en el caso de las muestras de raspados cervicales, no se realizó la digestión con la enzima *DdeI*. Los productos de la digestión se analizan en un gel de poliacrilamida al 8% el cual se tiñe con bromuro de etidio para observar las bandas esperadas de cada reacción (ver Tabla 2).

|       |                               | Homología (%) |
|-------|-------------------------------|---------------|
| LIC1  | 5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTT-3' |               |
| HPV 6 | .....A.....TA.....G           | 87            |
| HPV11 | .....A.....TA.....            | 87            |
| HPV16 | .....A..A.....                | 91            |
| HPV18 | .....G.....                   | 95            |
| HPV31 | .....G•AT•A.....              | 83            |
| HPV33 | .....A.....                   | 95            |
| LIC2  | 3'-GTTATGTCATAAATCCCAT-5'     |               |
| CONS. | 5'-CAATACAGAGTATTTAGGGTA-3'   |               |
| HPV 6 | .....G.....A.....G            | 86            |
| HPV11 | .....T.....G.....A.....       | 86            |
| HPV16 | .....G.....AA..               | 86            |
| HPV18 | .....T.....G                  | 90            |
| HPV31 | .....T•G.....T                | 86            |
| HPV33 | .....T•G•T.....C              | 81            |

Figura 2. Secuencia nucleotídica de los oligonucleótidos sintetizados (LIC1-LIC2) a partir de diversos tipos de HPV. CONS, secuencia consenso. Los nucleótidos homólogos están representados por puntos entre los distintos HPVs.

Tabla 2. ENZIMAS DE RESTRICCIÓN UTILIZADAS PARA TIPIFICAR EL PRODUCTO DE PCR-I.1 Y LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS ESPERADOS (pb).

| Enzima         | HPV-6          | HPV-11   | HPV-16  | HPV-18   | HPV-31  | HPV-33  | HPV-42  | HPV-52  | HPV-58  |
|----------------|----------------|----------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| <i>Rsa</i> 1   | - <sup>a</sup> | 204, 40  | -       | -        | 216, 40 | 141, 60 | -       | 190, 70 | 195, 65 |
|                |                |          |         |          |         | 40, 13  |         |         |         |
| <i>Dde</i> 1   | -              | -        | 169, 84 | 216, 37  | -       | -       | -       | 180, 80 | 170, 90 |
| <i>Hae</i> 111 | 207, 37        | 207, 307 | 200, 63 | 210, 43  | 122, 91 | 112, 91 | 140, 60 | 190, 50 | 200, 40 |
|                |                |          |         |          | 43      | 43, 10  |         |         |         |
| <i>Hinf</i> 1  |                | 147, 97  | -       | 141, 112 | -       | -       | -       | -       | -       |
| <i>Xba</i> 1   | 143, 101       | 143, 101 | -       | 146, 107 | -       | -       | -       | -       | -       |
| <i>Acc</i> 1   | -              | -        | 193, 60 | -        | 196, 60 | -       | -       | -       | -       |
| <i>Pst</i> 1   | -              | -        | -       | 190, 63  | -       | -       | -       | -       | -       |
| <i>Kpn</i> 1   | -              | -        | -       | -        | -       | 218, 38 | -       | -       | -       |

<sup>a</sup> no existe sitio de restricción en la secuencia del HPV

Referencia: Yoshikawa, y col. (1991). *Jpn. J. Cancer Res.* 82: 524-531.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSION**

### **5.1.- ESTANDARIZACION**

### **5.2.- DETECCION Y TIPIFICACION DE HPV EN BIOPSIAS**

### **5.3.- DETECCION Y TIPIFICACION DE HPV EN RASPADOS CERVICALES**

### **5.4.- INHIBICION EN LA REACCION DE PCR**

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1. Estandarización de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para este trabajo primeramente se utilizó el DNA del plásmido pHPV16, para estandarizar los parámetros requeridos en la PCR y después se emplearon con el de líneas celulares HeLa, SiHa y CasKi (ver material y métodos).

#### 5.1.1. DNA blanco

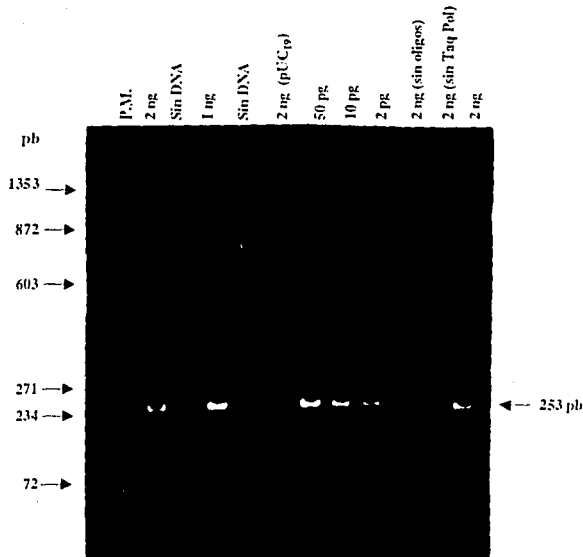
La PCR es tan sensible que en teoría la amplificación puede hacerse a partir de una sola molécula de DNA. Por lo general se usan de  $10^5$  a  $10^6$  copias de DNA blanco, es decir, de 300 ng a 3  $\mu$ g de DNA genómico humano (3 pg de DNA genómico es igual a 1 copia). En el caso de usarse genes clonados en plásmidos, es suficiente con 25 a 100 ng de DNA. Cantidades menores pueden utilizarse en la amplificación de genes que existen en varias copias, o de células infectadas por virus.

El primer parámetro a estandarizar en la reacción de PCR en este proyecto, fué la concentración de DNA para la amplificación de HPV.

En los ensayos realizados se manejaron diferentes concentraciones de DNA de pHPV16, en un margen de 2 pg a 2 ng. Las condiciones de reacción en las que se llevaron a cabo dichos experimentos se describen en material y métodos. Como resultado de estos estudios, encontramos que en las distintas concentraciones de DNA se logró obtener el producto de amplificación esperado de 253 pb, correspondiente a un fragmento de la región tardía L1 de los papilomavirus. En la Fig. 3-A se presenta el producto amplificado a partir de 2 pg hasta 2 ng de DNA. Es importante resaltar que la detección de HPV mediante esta técnica se puede realizar con concentraciones mínimas de DNA. La sensibilidad aproximada de la reacción de PCR considerando el tamaño del plásmido (10,686 pb) y tomando en cuenta los 2 pg del DNA inicial en la reacción se estima que en 2 fg del DNA se encuentran aproximadamente 200 moléculas del plásmido.

Mediante la técnica de PCR en conjunto con distintos métodos de biología molecular, la sensibilidad de la detección varía entre ng y pg del DNA viral. Rakoczy y col., [51], reportaron una sensibilidad de 1 fg del DNA de HPV-16 en 10 células SiHa, utilizando PCR y Dot blot. Por lo anterior, podemos decir que la sensibilidad que se logró obtener en este ensayo es alta y comparable a la reportada por otros grupos de trabajo.

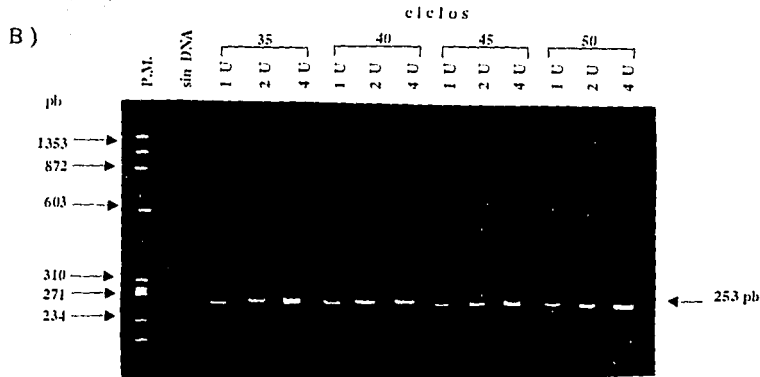
A)



**Figura 3.** Optimización de PCR para la amplificación de HPV-16  
 A).- Determinación de la concentración mínima de DNA de pHPV16 mediante la amplificación de la región L1. Los experimentos se realizaron usando diferentes cantidades de DNA plasmídico desde 2 pg a 2 ng. Varios controles fueron incluidos para certificar la especificidad de amplificación de HPV. Plásmido: 10,686 pb. P.M.  $\phi$ X174/ *Hae*III.

### 5.1.2. Enzima Taq DNA Polimerasa y número de ciclos

De las enzimas DNA polimerasas termoestables actualmente utilizadas para la PCR, la Taq DNA Polimerasa (peso molecular aproximado a 94 kD) (GIBCO BRL) es la más utilizada. La mayoría de los protocolos recomiendan el uso de 1 a 2.5 U de enzima por cada ensayo en volumen final de 100  $\mu$ l. Un parámetro importante, ligado a la concentración de enzima es el número de ciclos de amplificación. El número de ciclos promedio oscila entre los 20 y 35, dependiendo de la cantidad de DNA inicial en la reacción. En la Fig. 3-B se presentan los resultados obtenidos en la estandarización de las variables anteriormente descritas (concentración de enzima y número de ciclos). A partir de 2 pg de DNA blanco se realizó la amplificación con 1, 2 y 4 U de enzima a 35, 40, 45 y 50 ciclos respectivamente. Los resultados obtenidos en estos experimentos indican que a medida que aumenta la concentración de la enzima se obtiene mayor rendimiento en el producto de amplificación. Bajo las condiciones de reacción empleada podemos decir que manejando una concentración entre 1 y 2 U de enzima y aproximadamente 35 ciclos de reacción la amplificación se puede llevar a cabo de manera exitosa.

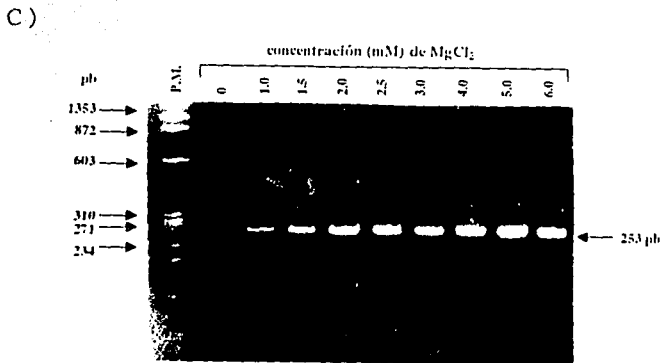


3-B).- Amplificación por PCR del DNA de pHPV16 usando diversas concentraciones de enzima Taq DNA pol (U) y diferentes ciclos de amplificación (C). Se utilizaron 2 pg de DNA y 1.5 mM de  $MgCl_2$  para la amplificación. P.M.  $\phi$ X174/*Hae*III

### 5.1.3. Concentración de Magnesio

La concentración de iones magnesio en la PCR es también determinante en la especificidad de la reacción. Concentraciones muy altas conducen a una baja especificidad, mientras que concentraciones mínimas necesarias disminuyen el índice de incorporaciones erróneas de nucleótidos, por lo que se recomienda optimizar la concentración de  $MgCl_2$  en cada reacción. Para una reacción estandar se recomienda utilizar una concentración final entre 0.5 y 2.5 mM.

Para llevar a cabo esta estandarización, se utilizaron 2  $\mu g$  del DNA del pHPV16, 2 U de enzima y 35 ciclos de reacción, manejando concentraciones crecientes desde 0 a 6 mM de  $MgCl_2$ . En la Fig. 3-C se presentan los resultados obtenidos y se puede constatar que existe un aumento en el producto de amplificación por lo menos hasta 5 mM de  $MgCl_2$ . Usando 6 mM aparentemente disminuye el producto, lo cual coincide con lo reportado en la literatura para esta reacción.



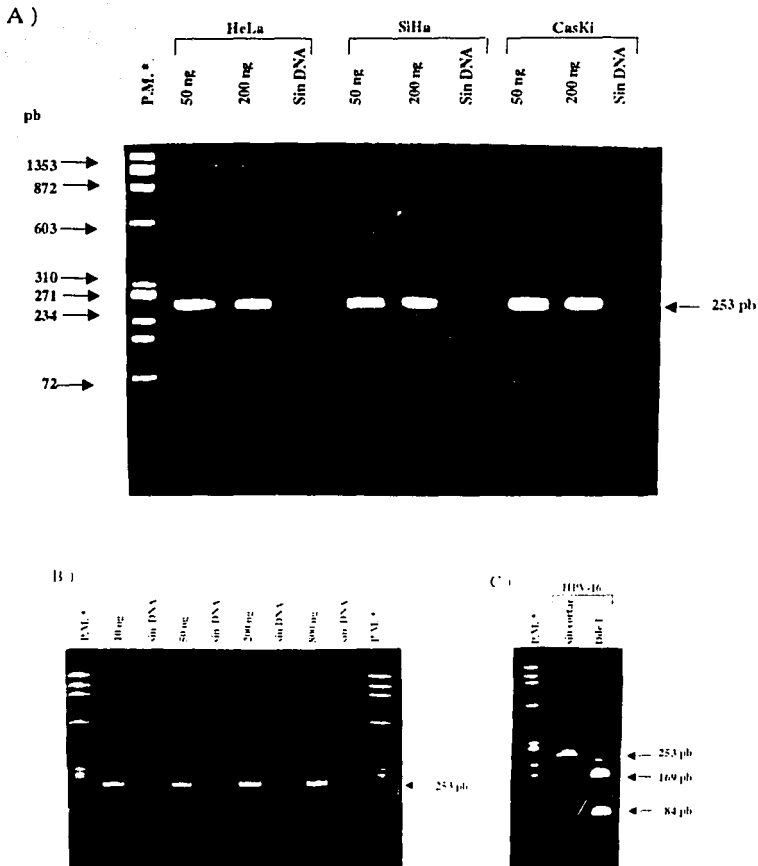
3-C).- Amplificación por PCR del DNA de pHPV16 usando diversas concentraciones de  $MgCl_2$  en la reacción. Para la reacción se utilizaron 2  $\mu g$  de DNA, 2 U de Taq DNA pol y 35 ciclos de reacción. P.M.  $\phi X174/HaeIII$



Como conclusión general de la estandarización de la reacción de PCR de acuerdo a los resultados obtenidos con relación a la concentración de DNA, enzima, número de ciclos y concentración de magnesio, las mejores condiciones logradas fueron las siguientes: 2 pg de DNA de plásmido (o su equivalente si se usa un fragmento con secuencias de HPV o células conteniendo DNA de HPV), 2 U de enzima en presencia de 1.5-2.0 mM de  $MgCl_2$  y 35 ciclos de reacción. Estos resultados de estandarización son similares con las condiciones propuestas para una reacción estandar de la PCR, descritas por distintos protocolos de investigación.

#### 5.1.4. Empleo de la técnica estandarizada

Una vez estandarizada la reacción de PCR, se utilizó con DNA extraído de las líneas celulares HeLa, SiHa y CasKi (ver material y métodos). En la Fig. 4-A se observan los resultados obtenidos de estos estudios, utilizando 50 y 200 ng del DNA celular. Se obtuvo el producto esperado de 253 pb, mediante PCR, correspondiente al HPV. También se observa diferencia entre la intensidad de las bandas debido probablemente a los distintos números de copias de HPV existentes en cada línea celular probada. De estos ensayos podemos decir que no existe una diferencia muy marcada en cuanto a la cantidad de producto amplificado, empleando 50 y 200 ng de DNA celular por lo que es importante señalar que a determinado número de ciclos en la PCR, la amplificación se detiene independientemente de la cantidad de DNA inicial porque empiezan a ser limitantes los demás componentes de la reacción [13]. Tomando en consideración el parámetro establecido por Ausubel y col., [58] que establece que una célula diploide contiene 7 pg de DNA, se puede estimar que los 50 y 200 ng del DNA equivalen a aproximadamente a  $7 \times 10^3$  y  $28 \times 10^3$  células respectivamente. En la Fig. 4-B se muestran los resultados de un ensayo realizado con distintas concentraciones de DNA purificado de células HeLa utilizando desde una concentración mínima de 10 ng, equivalente a un número aproximado de  $1.4 \times 10^3$  células. Relacionando esto con el número de copias de HPV en HeLa (de 10 a 50 copias de HPV-18 por célula) [40, 50], se concluye que existen entre 14,000 y 70,000 copias del virus.



**Figura 4. A).**- Amplificación de HPV-16 o HPV-18 por PCR en DNAs extraídos de líneas celulares. Para los experimentos se utilizaron 50 y 200 ng de DNA (aproximadamente  $7 \times 10^3$  y  $28 \times 10^3$  células) obtenido de HeLa (HPV-18), SiHa y CasKi (HPV-16).

**B).**- Amplificación de HPV-18 por PCR de DNA extraído de células HeLa empleando diversas concentraciones de DNA. La cantidad más baja (10 ng) equivale a  $1.4 \times 10^3$  células.

**C).**- Tipificación por análisis de restricción del producto de PCR (fragmento de 253 pb) del HPV-16 amplificado de células SiHa. La enzima *DdeI* corta al HPV-16 en dos fragmentos de 84 y 169 pb y corta a la vez a HPV-18 en 37 y 216 pb.

P.M.  $\phi$ X174/*HaeIII*.

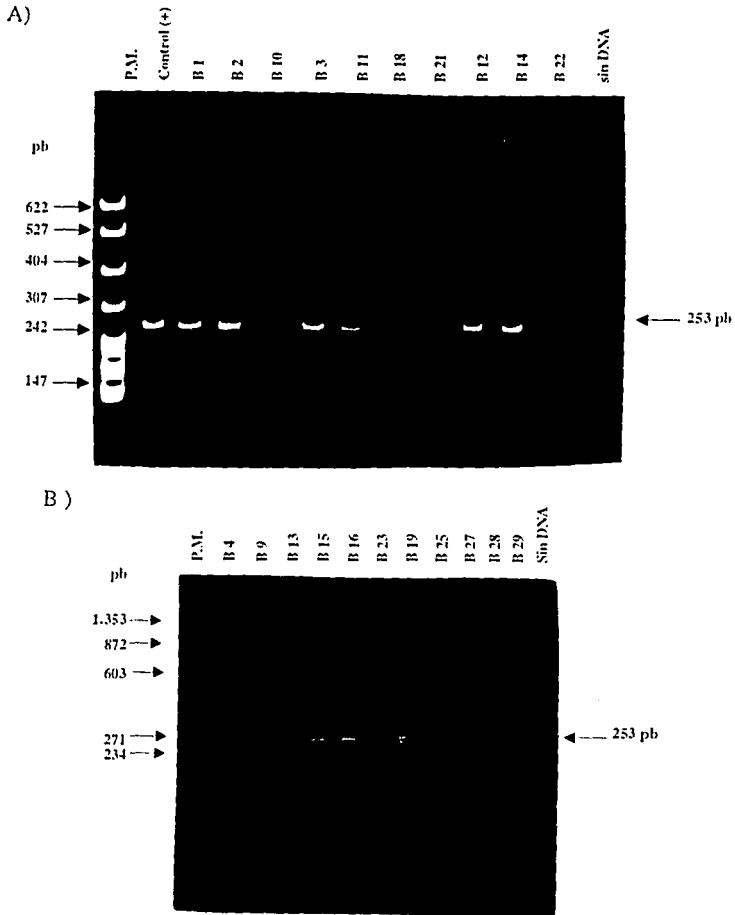
Para confirmar que el producto amplificado fuera el correspondiente a papilomavirus, se procedió a realizar la tipificación. En la Fig.4-C se muestra el producto de digestión con la enzima *DdeI* la cual corta, produciendo 2 bandas una de 84 pb y la otra de 169 pb en el producto amplificado del HPV tipo 16 (ver Tabla 2) proveniente, en este caso, con 10 ng del DNA de células SiHa, con lo cual se confirmó la presencia del virus. Estudios experimentales demuestran también una sensibilidad aproximada entre 15 ng y 100 ng de DNA celular [28, 45, 46]. Rakoczy y col., [51], reportan una sensibilidad de 10 a 1,000 células utilizando células SiHa (contiene de 1 a 2 copias de HPV-16 por célula) y el límite más bajo de detección reportado por Morrison y col., [60], es de 0.05 ng de DNA. En conclusión, nuestros experimentos sugieren que es posible detectar DNA de HPV a partir de 10 ng de DNA, tanto de células HeLa como de SiHa, usando las siguientes condiciones: 2 U de Taq DNA Pol, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 ng de cada oligo y 35 ciclos de amplificación.

## 5.2.- Detección y tipificación de HPV en DNA de biopsias

### 5.2.1. Muestras provenientes del Hospital Militar.

La detección de secuencias de DNA mediante la reacción de PCR (ver materiales y métodos) se realizó inicialmente en 40 muestras de pacientes con diferentes grados de lesión cervical.

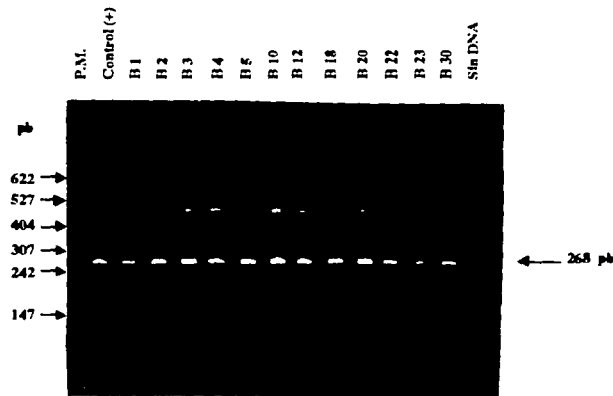
En la Figura 5 (A y B), se muestran los resultados obtenidos durante la amplificación del HPV presente en las muestras de biopsias. El fragmento de 253 pb, correspondiente al producto de amplificación (HPV), se detectó en algunas de las muestras analizadas mediante la técnica de PCR, en todas las muestras se amplificó la secuencia de DNA del gen de  $\beta$ -globina como control positivo; obteniendo una banda de 268 pb en todos los casos (Fig. 5-C). Lo anterior indica que las muestras negativas para HPV, no contienen secuencias virales. De los estudios de detección, se encontró que el 62 % de las muestras fueron positivas para HPV.



**Figura 5. Amplificación por PCR del DNA de HPV a partir de DNAs extraídos de biopsias con lesión cervical**

A) y B).- Amplificación por PCR con oligonucleótidos para L1 de HPV. Para el PCR se utilizaron 100 ng de DNA extraído de las biopsias, se incluyó un control (+) con 50 ng de DNA de células HeLa y un control (-) sin DNA en la reacción. P.M.: pBR322/*Msp*I (A) y  $\phi$ X174/*Hae*III (B).

C)



5-C).- Amplificación por PCR del gen  $\beta$ -globina a partir de DNA de biopsias positivas y negativas a HPV. Para el PCR se utilizaron 100 ng del DNA de biopsias y 100 ng del DNA de células HeLa como control positivo, y un control negativo sin DNA. Las biopsias B1, B18, B22 y B23 fueron negativas para HPV (parte A y B de esta figura). P.M. pBR322/*MspI*

De los casos de lesiones precancerosas el 61.5 % de las displasias y el 57 % de los NICs presentaron secuencias virales de HPV, sin embargo para las muestras con cáncer avanzado (CaCU) se encontró hasta un 83 %. Es importante mencionar que el alto porcentaje de incidencia de HPV en este último tipo de lesiones, sugiere su participación como un factor importante en el desarrollo del CaCU. En la Tabla 3 se presentan las características de las biopsias analizadas, así como, los resultados de la detección de HPV por PCR. Por otra parte en la Tabla 3.1 se presentan los resultados antes mencionados.

Tabla 3. **DETECCION DE HPV EN EL DNA DE BIOPSIAS (HOSPITAL MILITAR) MEDIANTE LA TECNICA DE PCR**

| No. | Estadio clínico | Tipo histológico | PCR HPV-L1 |     |
|-----|-----------------|------------------|------------|-----|
|     |                 |                  | (+)        | (-) |
| B1  | NIC III         | ND               | 3+         |     |
| B2  | NIC II          | ND               | 3+         |     |
| B3  | Displasia (Co.) | ND               | 3+         |     |
| B4  | Cáncer avanzado | Adenocarcinoma   | 3+         |     |
| B5  | Displasia (Co.) | ND               | +          |     |
| B6  | Displasia (Co.) | ND               | 3+         |     |
| B7  | NIC III         | ND               | 3+         |     |
| B8  | Cáncer avanzado | Epidermoide      | 3+         |     |
| B9  | Displasia (Co.) | ND               | 3+         |     |
| B10 | NIC III         | ND               | -          |     |
| B11 | NIC III         | ND               | 2+         |     |
| B12 | Cáncer avanzado | Adenocarcinoma   | 2+         |     |
| B13 | NIC III         | ND               | 2+         |     |
| B14 | Displasia (Co.) | ND               | 3+         |     |
| B15 | NIC II          | ND               | 3+         |     |
| B16 | Cáncer avanzado | Epidermoide      | 3+         |     |
| B17 | Displasia (Co.) | ND               | 2+         |     |
| B18 | Cáncer avanzado | Epidermoide      | -          |     |
| B19 | NIC III         | ND               | 3+         |     |
| B20 | NIC III         | ND               | +          |     |
| B21 | NIC III         | ND               | -          |     |
| B22 | NIC III         | ND               | -          |     |
| B23 | NIC I           | ND               | -          |     |
| B24 | NIC III         | ND               | -          |     |
| B25 | NIC III         | ND               | 2+         |     |
| B26 | Displasia (Co.) | ND               | 2+         |     |
| B27 | Cáncer avanzado | Adenocarcinoma   | 3+         |     |
| B28 | NIC III         | ND               | 2+         |     |
| B29 | Displasia (Co.) | ND               | 2+         |     |
| B30 | Displasia (Co.) | ND               | -          |     |
| B31 | Displasia (Co.) | ND               | -          |     |
| B32 | NIC I           | ND               | -          |     |
| B33 | NIC III         | ND               | -          |     |
| B34 | Displasia (Co.) | ND               | -          |     |
| B35 | NIC III         | ND               | +          |     |
| B36 | Displasia (Co.) | ND               | -          |     |
| B37 | Displasia (Co.) | ND               | -          |     |
| B38 | NIC III         | ND               | +          |     |
| B39 | NIC III         | ND               | -          |     |
| B40 | NIC III         | ND               | -          |     |

(+,-) presencia o ausencia de HPV determinado por PCR. 1+: débil, 2+: moderado y 3+: fuerte.  
 ND: No determinado por el patólogo; Co.: Condiloma; NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

**Tabla 3.1. Análisis de resultados de la determinación de HPV, en muestras de biopsias proporcionadas por el Hospital Militar.**

| No. de Muestras | Citología | HPV |     | % (+) |
|-----------------|-----------|-----|-----|-------|
|                 |           | (+) | (-) |       |
| 13              | Displasia | 8   | 5   | 61.5  |
| 21              | NICs      | 12  | 9   | 57    |
| 6               | CaCU      | 5   | 1   | 83    |
| Total: 40       |           | 25  | 15  |       |

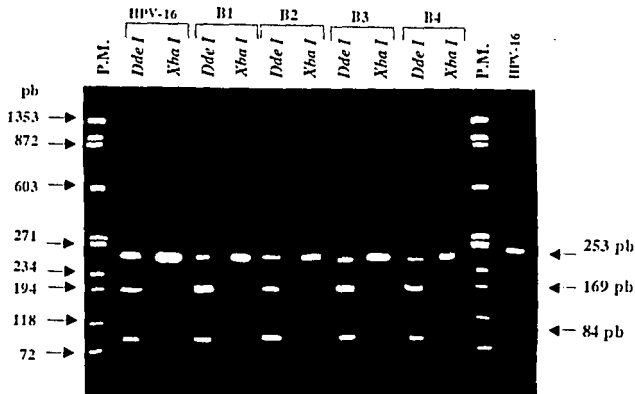
(+ ; -) presencia o ausencia de HPV. CaCU: cáncer cérvico-uterino.

NICs: Neoplasia Intraepitelial Cervical.

Las biopsias positivas y negativas para HPV son positivas (PCR) para  $\beta$ -globina.

La tipificación del papilomavirus se realizó a partir del producto amplificado, analizando la digestión con la enzima de restricción *DdeI*, la cual corta al DNA de HPV-16 y 18 en dos fragmentos de 84-169 y 37-216 pb respectivamente, y con la enzima *XbaI* que corta al HPV-18 en dos fragmentos (146 y 107 pb) y no corta al HPV-16. Para dicho estudio, se trabajó con un total de 4 muestras tomadas al azar (Figura 6) detectandose secuencias del papilomavirus tipo 16, en las muestras de biopsias con distinto grado de lesión cervical.

Estudios realizados en el Hospital Militar por el Dr. Berumen, se determinó la presencia de HPV en las mismas muestras de biopsias estudiadas en este trabajo, donde se utilizó oligonucleótidos diseñados para los genes tardíos E6-E7 del papilomavirus. En este caso la tipificación se realizó mediante la técnica de hibridación *in situ*, utilizando oligonucleótidos tipo específico para los papilomavirus tipos 16 y 18 (Tabla 4, Tipo HPV).



**Figura 6. Tipificación de HPV por análisis de restricción con las enzimas *DdeI* y *XbaI* en biopsias de CaCU.** La enzima *DdeI*, corta al HPV-16 y 18 en dos fragmentos 84-169 y 37-216 pb respectivamente y la enzima *XbaI* corta el HPV-18 en dos fragmentos 107 y 146 pb, pero no corta el DNA de HPV-16. P.M.  $\phi$ X174/*HaeIII*.

Comparando la detección realizada con los oligos E6-E7 y la de los oligos para L1 del HPV, los resultados son semejantes con respecto a la presencia del virus en las distintas lesiones cervicales, por lo que ambas secuencias diseñadas pueden ser utilizadas en la detección de HPV. Con respecto a los resultados de tipificación no se logró compararlos, en este ensayo, ya que por PCR HPV-L1 fueron muy pocas las muestras tipificadas, encontrándose mediante la técnica de hibridación la predominancia del HPV tipo 16 en el 72 % de las muestras. La presencia del HPV tipo 18, se detectó en solamente 3 de las 32 biopsias estudiadas, sin poder correlacionar este tipo con la agresividad del tumor ya que se presenta tanto en condilomas como en cáncer avanzado.



Tabla 4. RESULTADOS DE DETECCIÓN Y TIPIFICACION DE HPV EN DNA DE BIOPSIAS Y SU CORRELACIÓN CON LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA PROTEINAS DE HPV Y RAS

| No. | Estadio clínico | Tipo histológico | Tipo HPV |    | Anticuerpos |     |       | PCR HPV-11<br>(+) (-) |
|-----|-----------------|------------------|----------|----|-------------|-----|-------|-----------------------|
|     |                 |                  | 16       | 18 | αE7         | αE4 | otras |                       |
| B1  | NIC 111         | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B2  | NIC 11          | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B3  | Displasia (Co.) | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B4  | Cáncer avanzado | Adenocarcinoma   | 3+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B5  | Displasia (Co.) | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B6  | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B7  | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B8  | Cáncer avanzado | Epidermoide      | 3+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B9  | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B10 | NIC 111         | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B11 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | 2                     |
| B12 | Cáncer avanzado | Adenocarcinoma   | 2+       | -  | -           | -   | -     | 2                     |
| B13 | NIC 111         | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | 2                     |
| B14 | Displasia (Co.) | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B15 | NIC 11          | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B16 | Cáncer avanzado | Epidermoide      | 2+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B17 | Displasia (Co.) | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | 2                     |
| B18 | Cáncer avanzado | Epidermoide      | 2+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B19 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B20 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B21 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B22 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B23 | NIC 1           | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B24 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B25 | NIC 111         | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | 2                     |
| B26 | Displasia (Co.) | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | 2                     |
| B27 | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | NP                    |
| B28 | Displasia (Co.) | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | NP                    |
| B29 | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | NP                    |
| B30 | NIC 111         | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | NP                    |
| B31 | NIC 111         | ND               | 2+       | -  | -           | -   | -     | NP                    |
| B32 | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | NP                    |
| B33 | Cáncer avanzado | Adenocarcinoma   | 3+       | -  | -           | -   | -     | 3                     |
| B34 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | 2                     |
| B35 | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | 2                     |
| B36 | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B37 | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B38 | NIC 1           | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B39 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B40 | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B41 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B42 | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B43 | Displasia (Co.) | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B44 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | 4                     |
| B45 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |
| B46 | NIC 111         | ND               | 3+       | -  | -           | -   | -     | -                     |

(+,-) presencia o ausencia de HPV determinado por PCR; 1+: débil; 2+: moderado y 3+: fuerte

ND: No determinado por el patólogo; NP: No se proporcionó el DNA. Co.: Condiloma; NIC: Neoplasia intraepitelial cervical. De la muestra 33 a 46 no se realizaron los experimentos para tipo HPV ni para la detección de anticuerpos

Por otro lado se determinó la presencia de anticuerpos en las mismas muestras. La presencia de anticuerpos contra proteínas de (E4 y E7) HPV y ras se realizaron mediante la técnica de Western blot, la cual fué elaborada en el CISEI-INSP Cuernavaca, Mor. por el M. en C. Adolfo Pedroza. Sólo se describen los resultados (Tabla 4, Anticuerpos). Se obtuvieron los siguientes resultados: un 22% (7/32) fueron positivos para ras, 50% (16/32) positivos para E4 y en un 6.3% (2/32) de los pacientes se encuentran anticuerpos contra E7.

Se encontró: una prevalencia mayor de anticuerpos anti-ras en lesiones precancerosas en comparación con un cáncer avanzado, los anticuerpos anti-E4 no se asociaron típicamente a algún estadio clínico, y los anticuerpos contra E7 se ven asociados discretamente a lesiones como NIC III y cá. avanzado. Para algunos casos se pudo establecer una correlación directa entre: el estado avanzado de una lesión, la presencia de HPV-16 y la detección de anticuerpos anti-E7 en el suero indicando esto la presencia de la infección por HPV. Se concluye que el sistema inmune es capaz de reconocer antígenos virales como E7 y E4 de HPV-16, e incluso celulares posiblemente mutados como ras [7, 8, 16, 19, 20]. Las proteínas de la familia ras están presentes en los tejidos de individuos normales, y juegan un papel muy importante en el crecimiento y la diferenciación celular. Por otro lado: Ocadiz, y cols., [17]; Riou, y cols., [56], demostraron que en pacientes con CaCU hay una alta frecuencia de alteraciones en los genes *c-myc* y *Ha-ras*, la proteína ras se encuentra frecuentemente en tumores humanos y en lesiones preneoplásicas. La proteína E4, ha sido propuesta como participante en la replicación viral [7, 8, 19], se ha reportado que esta proteína se transcribe abundantemente en lesiones precancerosas cervicales, y en menor grado en CaCU, lo cual posibilitaría la producción de gran cantidad de proteína, y ésta a su vez ser suficiente para desencadenar una respuesta inmune humoral [15]. En este estudio es importante tener en cuenta que no todas las lesiones cervicales tienen DNA de HPV y aún menos del HPV-16. Es decir, que es posible que un alto porcentaje de los pacientes infectados con HPV-16, pudieran desarrollar anticuerpos contra la oncoproteína E7 del papilomavirus.

### 5.2.2. Muestras provenientes de la clínica 4 "Castelazo Ayala".

En otro grupo de muestras pertenecientes a 18 pacientes con lesiones cervicales de tipo NIC III y cáncer avanzado (adenocarcinoma y epidermoide), se determinó la presencia y tipo de HPV. En la Tabla 5 se presenta el estadio clínico y el tipo histológico de las biopsias en estudio. El análisis de secuencias virales mediante PCR, permitió detectar el genoma viral en el 83% (15/18) del total de muestras analizadas. El papilomavirus tipificado en las muestras corresponde al tipo 16 de acuerdo al análisis de restricción (para *Xba*I y *Acc*I). Los resultados correspondientes al estudio de detección y tipificación de este bloque de muestras se resumen en la Tabla 5.1.

Tabla 5. Detección y tipificación de HPV en DNA de biopsias (clínica 4 "Castelazo Ayala").

| No. | Estadio clínico | Tipo histológico | PCR HPV |      |
|-----|-----------------|------------------|---------|------|
|     |                 |                  | (+, -)  | Tipo |
| 1   | IV B            | Adenocarcinoma   | -       | -    |
| 2   | III B           | Adenocarcinoma   | -       | -    |
| 3   | III B           | Epidermoide      | -       | -    |
| 4   | II B            | Epidermoide      | ++      | 16   |
| 5   | Cá. avanzado    | *                | ++      | 16   |
| 6   | III B           | Epidermoide      | ++      | 16   |
| 7   | I B             | Epidermoide      | +       | 16   |
| 8   | II B            | Adenocarcinoma   | +       | 16   |
| 9   | I B             | Adenocarcinoma   | +       | 16   |
| 10  | II B            | Epidermoide      | ++      | 16   |
| 11  | NIC III         | *                | ++      | 16   |
| 12  | III B           | Epidermoide      | ++      | 16   |
| 13  | II B            | *                | ++      | 16   |
| 14  | NIC III         | *                | +       | 16   |
| 15  | II B            | *                | ++      | 16   |
| 16  | III B           | *                | ++      | 16   |
| 17  | I B             | *                | +       | 16   |
| 18  | II B            | *                | +       | 16   |

(+, -) presencia o ausencia de HPV determinada por la amplificación con los oligonucleótidos L1-C1 y L1-C2, que amplifican los tipos HPV-6, 11, 16, 18, 31, 33, 42, 52, 58. El tipo de HPV se determinó mediante digestión con enzimas de restricción *Xba*I (corta HPV-18 y no al HPV-16) y *Acc*I (corta al HPV-16 y no al HPV-18).

(\*): El tipo histológico no fue clasificado por el patólogo en las muestras 5, 11 y 13-18.

**Tabla 5.1. Determinación de la presencia y tipificación de HPV en DNA de biopsias (clínica 4 "Castelazo Ayala")**

| No. de Muestras | HPV          |             | Tipificación |        |
|-----------------|--------------|-------------|--------------|--------|
|                 | (+)          | (-)         | HPV-16       | HPV-18 |
| 18              | 15<br>(83 %) | 3<br>(17 %) | 15/15        | 0      |

(+, -) presencia o ausencia de HPV. Las biopsias positivas y negativas para HPV son positivas para  $\beta$ -globina (PCR). Como control positivo para la detección y tipificación de HPV se utilizó el DNA de células HeLa (HPV-18), Silla y CasKi (HPV-16).

Al igual que en los estudios realizados en la sección 6.1, se determinó la presencia de secuencias del gen de  $\beta$ -globina, como un control interno para la reacción de PCR, dando resultados positivos en todos los casos.

En la Tabla 6 se presentan resumidos los resultados correspondiente a las biopsias analizadas en este trabajo. En este estudio se encontraron secuencias nucleotídicas del DNA de HPV tanto en muestras con lesiones cervicales, como en aquellas que presentan casos de cáncer avanzado. Adicionalmente, el papiloma tipo 16 se encontró en todos los casos analizados. Sin embargo, en ninguna de las muestras tipificadas se determinó el tipo de HPV-18. Por su parte el grupo del Dr. Gariglio y col. [18] reportaron en muestras de biopsias (con lesión cervical NIC III y CaCU), la presencia de secuencias virales (HPV) en un 31 % correspondientes al tipo-16, en la población mexicana. Existen diversos estudios epidemiológicos elaborados por otros grupos de investigadores los cuales han reportado la presencia del papilomavirus entre un 30 y 90 % de los casos de lesiones tempranas (NICs) y en los casos de un cáncer invasor [14, 31, 34, 41-46, 51, 57, 60]. También se reporta el predominio del tipo-16 de alto riesgo y en un menor grado el tipo-18, así como también, la presencia de 2 o más tipos virales en una misma muestra.

**Tabla 6. Resumen de los resultados obtenidos en la determinación de HPV por PCR y tipificación en muestras de DNA de biopsias.**

| No. de Muestras | Citología | HPV |     | Tipificación |        |
|-----------------|-----------|-----|-----|--------------|--------|
|                 |           | (+) | (-) | HPV-16       | HPV-18 |
| 13              | Displasia | 8   | 5   | 1/1          | 0      |
| 23              | NICs      | 14  | 9   | 4/4          | 0      |
| 22              | CaCU      | 18  | 4   | 14/14        | 0      |
| Total: 58       |           | 40  | 18  | 19/19        |        |

Muestras provenientes del Hospital Militar y de la clínica 4 Castelazo Ayala. (+, -) presencia o ausencia de HPV. CaCU: cáncer cervico-uterino. NICs: Neoplasia Intraepitelial Cervical. Las muestras HPV (-) y (+), son positivas (PCR) para  $\beta$ -globina. Como control positivo para la detección y tipificación de HPV se utilizó DNA de células HeLa (HPV-18), SiHa y CasKi (HPV-16).

### 5.3.- Detección y tipificación de HPV en DNA de muestras de raspado cervical

Inicialmente se evaluaron las diferentes metodologías de extracción de DNA (ver material y métodos) en células control (HeLa, SiHa y CasKi), con la finalidad de seleccionar el método más apropiado para el tratamiento de muestras de raspado cervical.

En la Figura 7A, se presentan los resultados obtenidos por el tratamiento con "buffer K" y "ebullición en agua". En ambos casos se logró la amplificación del producto esperado (253 pb) para HPV, a partir de un número de 20 células (HeLa). Sin embargo el tratamiento con "buffer K" aparentemente resulta ser más eficiente, lo que puede atribuirse al contenido de proteinasa K.

Ambos tratamientos fueron aplicados a un primer grupo de muestras de raspados cervicales (RC), no obstante los resultados fueron negativos ya que no se detectó producto de amplificación. Lo anterior se puede observar en la Figura 7B.

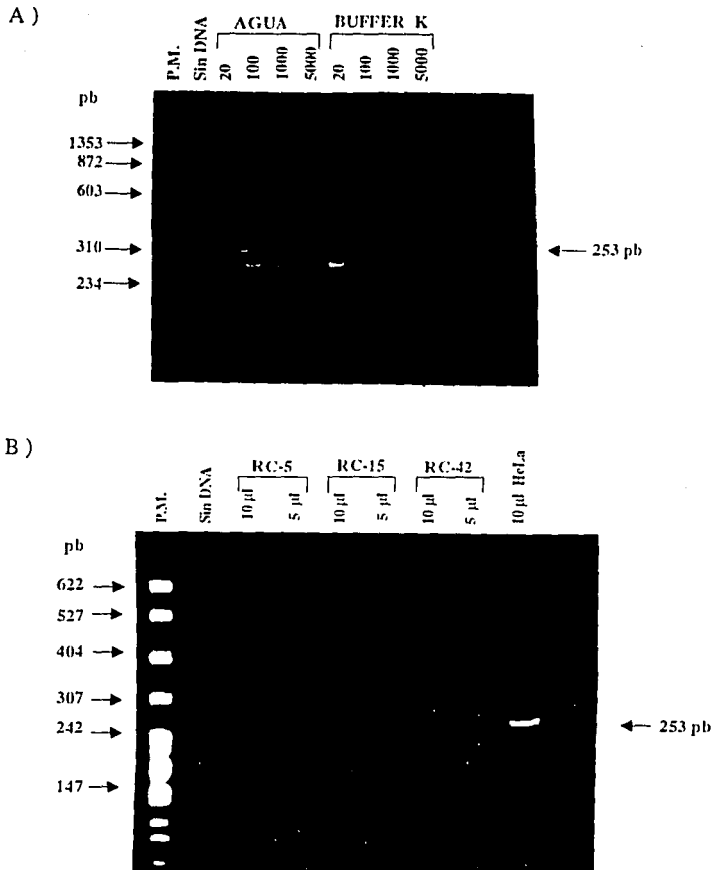


Figura 7. A).- Amplificación de HPV a partir de 20, 100, 1000 y 5000 células HeLa que corresponden a 142 pg, 710 pg, 7.1 ng y 35.5 ng respectivamente, mediante el tratamiento de "Ebullición en agua" y "Buffer K".

P.M.  $\phi$ X174/ *Hae*III.

B).- Ausencia de amplificación de HPV en muestras de células de raspados cervicales (RC) tratadas con "Buffer K". RC-5, 15 y 42 corresponden a muestras que no presentaron amplificación para HPV-L1 ni para  $\beta$ -globina. En la reacción se utilizaron 5 y 10  $\mu$ l iniciales que corresponden a 500 y 1000 células respectivamente. P.M. pBR322/*Msp*I.

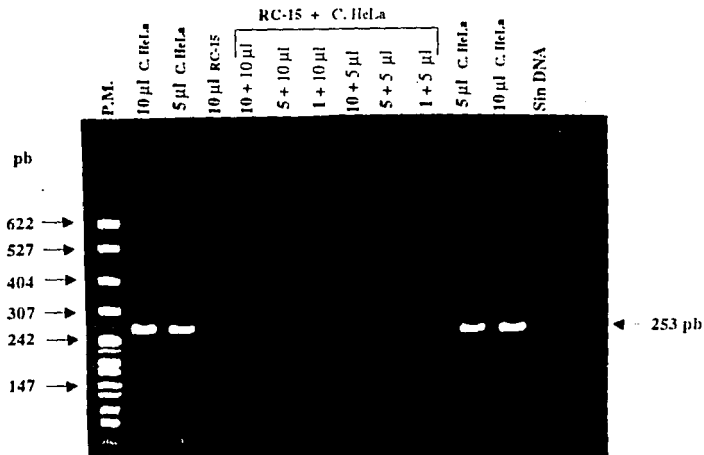
Cabe señalar que a el mismo grupo de muestras se les realizó la amplificación para  $\beta$ -globina, como control de la calidad del DNA celular obteniéndose los mismos resultados negativos. Esto último sugiere que los tratamientos no sean los adecuados para este tipo de muestras biológicas, o bien que la muestra de RC contenga algún componente que pudiera intervenir en la reacción de PCR y por lo tanto la este inhibiendo (ver mas adelante). Posteriormente se realizaron una serie de experimentos con la finalidad de demostrar la presencia de un efecto inhibitor sobre la reacción de amplificación. El ensayo consistió en mezclar una cierta cantidad de células control (HeLa) con la muestra de raspado cervical (no amplificada por PCR), en ambos casos se les aplico el tratamiento con "Buffer K" previo a la reacción de PCR. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Fig. 7C donde se muestran las diferentes combinaciones de células control y raspado cervical. Se obtuvo que con tan sólo 100 células del RC contra 1000 células (ver 1  $\mu$ l de RC + 10  $\mu$ l HeLa, en la Fig. 7-C) es decir, alrededor de 700 pg del DNA de la muestra de raspado cervical contra 7 ng del DNA de HeLa, se produce el efecto inhibitorio.

Como puede observarse, no se encontró producto de amplificación en ninguna de las combinaciones estudiadas, lo anterior apoya fuertemente la hipótesis de la existencia de inhibidores de la reacción de PCR en las muestras cervicales.

Tomando en cuenta que existen diversos trabajos de investigación respecto al uso de PCR, en los cuales se aplica la extracción de DNA de muestras biológicas, se decidió analizar esta última como una alternativa para el tratamiento de raspados cervicales.

La extracción fenólica (ver material y métodos) es un método que permite obtener DNA con cierto grado de pureza para la reacción de PCR. De esta manera se procedió a realizar extracciones de DNA a partir de células HeLa y raspados cervicales (muestra problema RC-15). Al igual que en el experimento anterior se hicieron combinaciones de muestras control y la muestra problema, para llevar a cabo la amplificación de secuencias de HPV y de  $\beta$ -globina

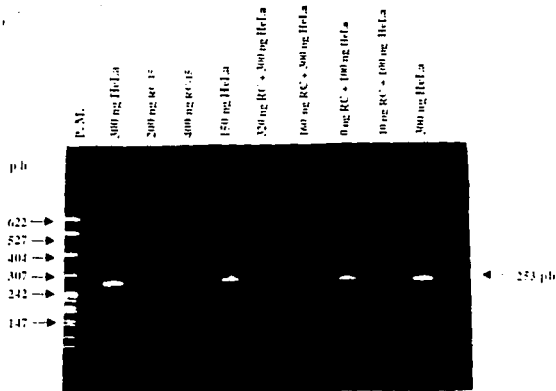
C)



7-C).- Inhibición de la amplificación de HPV de células HeLa por combinación con la muestra RC-15 tratada con "Buffer K". Para el PCR se colocaron en la mezcla de reacción 10, 5 y 1 µl de células HeLa (correspondientes a 1000 y 500 células). P.M. pBR322/*Msp* I

Los problemas de inhibición, aún con el manejo de DNA purificado también se presentaron para esta misma muestra biológica, lo cual se puede constatar en la Fig. 7D. Esta inhibición se observó incluso con tan sólo 10 ng del DNA de una muestra de RC contra 100 ng del DNA purificado de células HeLa. Sin embargo, aun presentandose el problema de inhibición con este método de extracción de DNA (extracción féolica), se procedió a analizar el resto de las muestras de raspados cervicales previo a la reacción de PCR.





7-D).- Inhibición de la amplificación de HPV en DNA extraído de células HcLa producida por la combinación con el DNA extraído de la muestra RC-15. Para los experimentos de inhibición se utilizaron 10, 160 y 320 ng del DNA de la muestra RC-15 contra 100 y 300 ng del DNA de HcLa.  
P.M. pBR322/*MspI*

En la Figura 8-A se presenta un ejemplo de muestras de raspados cervicales donde se obtuvieron productos de amplificación indicando la presencia del virus HPV (muestras RC: 3, 9, 16, 48, 34, 51, 55 y 59), así como también casos negativos (RC: 14, 20) para HPV y casos de inhibición de la reacción de PCR (RC: 5, 15). En todos los casos se realizó la amplificación del gen de  $\beta$ -globina como control de la reacción de amplificación, en la Figura 8-B se muestra un ejemplo de las muestras positivas (RC: 3, 9, 48, 34, 55 y 59) y negativas (RC: 14, 20, 19 y 21) para HPV, lograndose la amplificación para este gen, así como también, 2 muestras con inhibición (RC: 5 y 15) tanto para HPV como para  $\beta$ -globina. Por otra parte en la Figura 9 (A y B) se observa la tipificación de algunas muestras de RC, utilizando las enzimas restricción *AclI* y *XbaI*, incluyendo una serie de controles: HPV-11, 16 y 18 y algunas muestras para HPV (RC-3, 4, 7, 8, 16, 47 y 55).

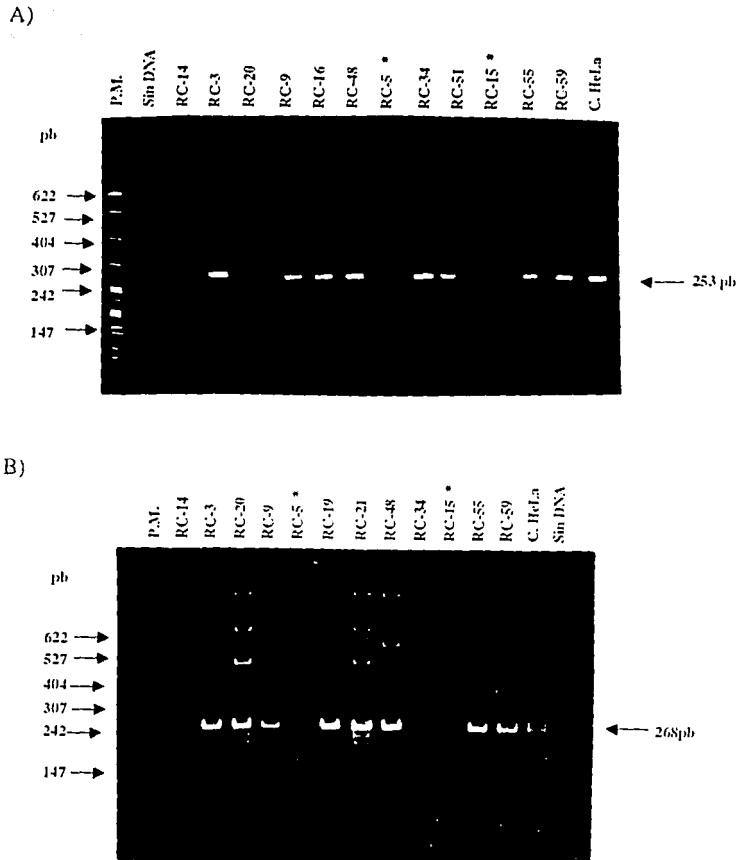


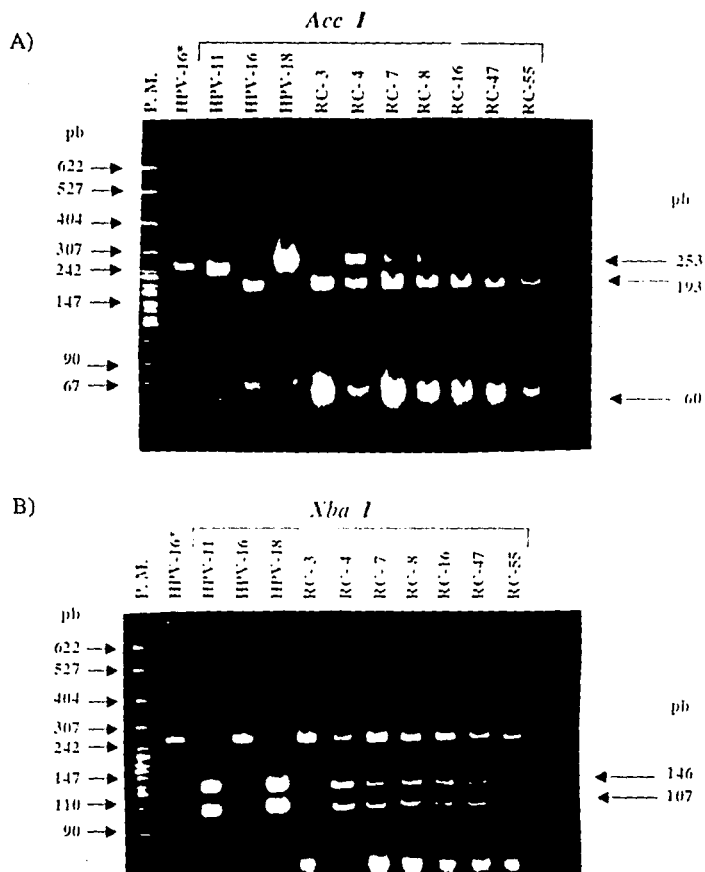
Figura 8. Amplificación por PCR de HPV y del gen de la  $\beta$ -globina en muestras de raspados cervicales (RC).

A).- Para el PCR se utilizaron oligos de la región L1 y 500 ng de DNA de muestras de RC.

B).- Amplificación de  $\beta$ -globina con 500 ng del DNA de muestras de RC.

\* Muestras que inhiben una reacción de PCR (ver figura 7B y 7C).

P.M. pBR322/*MspI*



**Figura 9.** Tipificación de HPV por análisis de restricción en muestras de raspado cervical

A).- El producto de PCR de varias muestras fue digerido con la enzima de restricción *AccI* (corta HPV-16 y genera dos fragmentos de 193 y 60 pb; no corta HPV-18 ni HPV-11).

B).- El producto de PCR de HPV de varias muestras fue digerido con la enzima de restricción *XbaI* (corta a HPV-11 y 18 generando dos fragmentos de 143-101 y 146-107 pb respectivamente y no corta HPV-16).

\*HPV-16 sin cortar. P.M. pBR322/*MspI*

Se analizó la presencia de secuencias del virus del papiloma humano en un total de 108 muestras de DNA extraído de raspados cervicales (Tabla 7). De este total de muestras, 30 (28%) resultaron negativas para HPV y negativas para  $\beta$ -globina (Tabla 7.1) por lo que se decidió descartarlas del estudio al no poder confirmar la presencia de HPV.

El análisis de las 78 muestras positivas para  $\beta$ -globina se describe en la Tabla 7.2 y 7.3. En la Tabla 7.2 se indica que el 58% (45/78) fueron positivos para HPV y el 42% (33/78) fueron negativas. De las 45 muestras positivas solamente 26 fueron tipificadas presentando en su totalidad el tipo 16 y de estas, 7 presentaron a la vez el HPV tipo 18.

Tabla 7. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE HPV-L1 A PARTIR DE DNA DE MUESTRAS DE RASPADOS CERVICALES.

| No.   | No. de folio | Citología       | PCR HPV |     | PCR $\beta$ -globina |   | Tipificación |        |
|-------|--------------|-----------------|---------|-----|----------------------|---|--------------|--------|
|       |              |                 | (+)     | (-) |                      |   | HPV-16       | HPV-18 |
| RC-1  | 500          | Control         | ++      | -   | ++                   | - | +            | +      |
| RC-2  | 761          | Cá. avanzado    | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-3  | 1090         | Control         | +++     | -   | +++                  | - | +            | -      |
| RC-4  | 1172         | Control         | ++      | -   | ++                   | - | +            | +      |
| RC-5  | 1196         | <i>in situ</i>  | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-6  | 2350         | Control         | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-7  | 2732         | Control         | ++      | -   | +++                  | - | +            | +      |
| RC-8  | 2750         | Control         | ++      | -   | ++                   | - | +            | +      |
| RC-9  | 2776         | Control         | +       | -   | +                    | - | +            | -      |
| RC-10 | 3098         | Displasia (Co.) | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-11 | 3010         | Cá. avanzado    | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-12 | 762          | Displasia (Co.) | -       | -   | +++                  | - | -            | -      |
| RC-13 | 763          | Cá. avanzado    | -       | -   | +++                  | - | -            | -      |
| RC-14 | 501          | Control         | -       | -   | ++                   | - | -            | -      |
| RC-15 | 3008         | Cá. avanzado    | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-16 | 3102         | Displasia (Co.) | ++      | -   | +++                  | - | +            | +      |
| RC-17 | 1092         | Control         | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-18 | 760          | Control         | -       | -   | ++                   | - | -            | -      |
| RC-19 | 1091         | Control         | -       | -   | ++                   | - | -            | -      |
| RC-20 | 1114         | Control         | -       | -   | +++                  | - | -            | -      |
| RC-21 | 1118         | Cá. avanzado    | -       | -   | +++                  | - | -            | -      |
| RC-22 | 768          | Control         | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-23 | 1093         | Control         | -       | -   | +++                  | - | -            | -      |
| RC-24 | 3100         | Control         | -       | -   | +++                  | - | -            | -      |
| RC-25 | 1195         | Cá. avanzado    | -       | -   | +++                  | - | -            | -      |
| RC-26 | 3000         | Cá. avanzado    | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-27 | 3005         | Cá. avanzado    | -       | -   | +++                  | - | -            | -      |
| RC-28 | 3024         | <i>in situ</i>  | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-29 | 1166         | Cá. avanzado    | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-30 | 2729         | Control         | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-31 | 3001         | Cá. avanzado    | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-32 | 2728         | Control         | -       | -   | +++                  | - | -            | -      |
| RC-33 | 1199         | Control         | -       | -   | -                    | - | -            | -      |
| RC-34 | 2286         | Control         | ++      | -   | ++                   | - | +            | -      |
| RC-35 | 2287         | Control         | ++      | -   | ++                   | - | +            | -      |

HPV-L1: detección de HPV usando oligonucleótidos específicos del gen viral L1. RC: raspado cervical.  
 (+), (-): presencia o ausencia de HPV; NT: no tipificado. Ca: cáncer. Co.: condiloma; Control: muestras diagnósticas clínicamente con citología normal. Las muestras en negrilla representan muestras que se trabajaron en los experimentos para comprobar la ausencia de amplificación en la reacción de PCR, tanto para HPV como para  $\beta$ -globina.

Tabla 7. CONTINUACION

| No.   | No. de folio | Citología      | PCR HPV |     | PCR $\beta$ -globina | Tipificación |        |
|-------|--------------|----------------|---------|-----|----------------------|--------------|--------|
|       |              |                | (+)     | (-) |                      | HPV-16       | HPV-18 |
| RC-36 | 3027         | Cá. avanzado   | ++      | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-37 | 2292         | Control        | ++      | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-38 | 257          | Control        | ++      | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-39 | 367          | Control        | ++      | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-40 | 373          | Control        | ++      | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-41 | 557          | Control        | ++      | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-42 | 1018         | Displasia      | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-43 | 1138         | Cá. avanzado   | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-44 | 1154         | Cá. avanzado   | +       | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-45 | 1158         | Cá. avanzado   | -       | -   | +++                  | -            | -      |
| RC-46 | 2115         | Control        | +       | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-47 | 2303         | Control        | ++      | -   | ++                   | +            | +      |
| RC-48 | 3040         | <i>in situ</i> | +++     | -   | +++                  | +            | -      |
| RC-49 | 3042         | <i>in situ</i> | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-50 | 3045         | Control        | +       | -   | ++                   | +            | +      |
| RC-51 | 3046         | Cá. avanzado   | +       | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-52 | 1055         | Control        | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-53 | 1153         | <i>in situ</i> | ++      | -   | +++                  | +            | -      |
| RC-54 | 1014         | Cá. avanzado   | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-55 | 2106         | Control        | ++      | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-56 | 2111         | Control        | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-57 | 2118         | Control        | ++      | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-58 | 2133         | Control        | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-59 | 1038         | Cá. avanzado   | ++      | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-60 | 3015         | Control        | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-61 | 3032         | <i>in situ</i> | -       | -   | +++                  | -            | -      |
| RC-62 | 488          | Control        | ++      | -   | ++                   | +            | -      |
| RC-63 | 555          | Control        | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-64 | 1016         | Cá. avanzado   | -       | -   | ++                   | -            | -      |
| RC-65 | 2279         | Control        | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-66 | 2088         | Control        | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-67 | 4020         | Control        | ++      | -   | ++                   | NT           | NT     |
| RC-68 | 3158         | Control        | ++      | -   | ++                   | NT           | NT     |
| RC-69 | 4022         | Control        | ++      | -   | ++                   | NT           | NT     |
| RC-70 | 4015         | Control        | +       | -   | ++                   | NT           | NT     |
| RC-71 | 3224         | Control        | +       | -   | ++                   | NT           | NT     |
| RC-72 | 3215         | <i>in situ</i> | +       | -   | ++                   | NT           | NT     |

HPV-11: detección de HPV usando oligonucleótidos específicos del gen viral 1.1. RC: raspado cervical; (+), (-): presencia o ausencia de HPV; NT: no tipificado. Ca: cáncer; Co.: condiloma; Control: muestras diagnósticas clínicamente con citología normal. Las muestras en negrilla representan muestras que se trabajaron en los experimentos para comprobar la ausencia de amplificación en la reacción de PCR, tanto para HPV como para  $\beta$ -globina.

Tabla 7. CONTINUACION

| No.    | No. de folio | Citología      | PCR HPV |     | PCR $\beta$ -globina | Tipificación |        |
|--------|--------------|----------------|---------|-----|----------------------|--------------|--------|
|        |              |                | (+)     | (-) |                      | HPV-16       | HPV-18 |
| RC-73  | 9991         | Control        | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-74  | 4012         | Control        | ++      | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-75  | 3202         | Cá. avanzado   | ++      | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-76  | 3254         | Control        | +       | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-77  | 2431         | Control        | +       | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-78  | 2288         | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-79  | 3209         | <i>in situ</i> | ++      | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-80  | 1938         | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-81  | 1187         | Displasia      | +       | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-82  | 1171         | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-83  | 1132         | <i>in situ</i> | +       | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-84  | 1127         | Displasia      | +++     | +++ | NT                   | NT           | -      |
| RC-85  | 530          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-86  | 677          | Cá. avanzado   | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-87  | 589          | Control        | +       | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-88  | 675          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-89  | 536          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-90  | 569          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-91  | 508          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-92  | 680          | Displasia      | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-93  | 511          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-94  | 532          | Control        | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-95  | 538          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-96  | 665          | Cá. avanzado   | ++      | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-97  | 576          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-98  | 256          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-99  | 587          | Control        | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-100 | 594          | Control        | ++      | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-101 | 591          | Control        | ++      | ++  | NT                   | NT           | -      |
| RC-102 | 664          | <i>in situ</i> | -       | -   | -                    | -            | -      |
| RC-103 | 662          | Cá. avanzado   | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-104 | 556          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-105 | 676          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-106 | 571          | Control        | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-107 | 3237         | Cá. avanzado   | -       | +   | -                    | -            | -      |
| RC-108 | 598          | Control        | ++      | ++  | NT                   | NT           | -      |

HPV-1.1: detección de HPV usando oligonucleótidos específicos del gen viral 1.1. RC: raspado cervical; (+) (-): presencia o ausencia de HPV; NT: no tipificado. Cá: cáncer; Co.: condiloma. Control: muestras diagnósticas clínicamente con citología normal. Las muestras en negrilla representan muestras que se trabajaron en los experimentos para comprobar la ausencia de amplificación en la reacción de PCR, tanto para HPV como para  $\beta$ -globina.

Los resultados de los controles obtenidos para este estudio provenientes de 53 mujeres normales (controles RC), y de pacientes con displasia, cáncer *in situ* y CaCU se observan en la Tabla 7.3. Un 58% (31/53) de las muestras de los controles (diagnosticadas por citología sin lesión cervical) dieron positivo para HPV. A 19 muestras positivas se les detectó el HPV tipo-16 en su totalidad y a 6 de estas mismas también se les detectó el tipo-18. Cabe señalar que en algunos controles (RC) y displasias positivos, se presentaron ambos tipos de HPV.

Para los casos de displasia se presentó el HPV en un 75% y en cáncer *in situ* se detectó el HPV en un 83%. En muestras con cáncer avanzado se detectó el HPV en un 40%, se tipificaron solamente 4 de estas muestras presentando el HPV tipo 16 (ver Tabla 7.2.).

El elevado porcentaje de resultados positivos en las muestras control se le puede atribuir principalmente a la alta eficiencia del método de PCR ya que puede detectar infecciones no visibles-mínimas, que por otros métodos no son detectables.

De los distintos estudios relacionados con la detección de muestras de raspado cervical se ha reportado la presencia de HPV tanto en controles (citología normal) como en pacientes con lesiones cervicales precancerosas y cancerosas. Kurz y col., [53] reportaron la presencia de HPV en 84% de los controles, otros estudios epidemiológicos reportan desde 0 a 80 % la presencia de HPV en controles [41, 43, 51, 60].

En el caso de las lesiones tempranas y CaCU se reporta la presencia de HPV hasta en un 90% [46-52, 60].

Tabla 7.1. Análisis global de la detección del gen de  $\beta$  globina en muestras de raspado cervical.

| No. de Muestras<br>totales | $\beta$ -globina |                |
|----------------------------|------------------|----------------|
|                            | ( + )            | ( - )          |
| 108                        | 78<br>( 72 % )   | 30<br>( 28 % ) |

( + , - ) presencia o ausencia del gen de  $\beta$ -globina.



Tabla 7.2. Resultados obtenidos en la determinación de presencia de HPV y tipificación en muestras de raspados cervicales.

| * No. de muestras | HPV |     | Tipificación |        |
|-------------------|-----|-----|--------------|--------|
|                   | (+) | (-) | HPV-16       | HPV-18 |
| 78                | 45  | 33  | 26/26        | 7/26   |

(+, -) presencia o ausencia de HPV.

Las muestras HPV (+) y (-) son positivas (PCR) para  $\beta$ -globina.

\* Se excluyen las muestras que presentaron problemas de inhibición en la reacción de PCR.

Tabla 7.3 Determinación de la presencia de HPV por PCR y tipificación en muestras de raspados cervicales.

| No. de Muestras | Citología      | HPV |     | % HPV (+) | Tipificación |        |
|-----------------|----------------|-----|-----|-----------|--------------|--------|
|                 |                | (+) | (-) |           | HPV-16       | HPV-18 |
| 53              | Control (RC)   | 31  | 22  | 58        | 19/19        | 6/19   |
| 4               | Displasia      | 3   | 1   | 75        | 1/1          | 1/1    |
| 15              | CaCU           | 6   | 9   | 40        | 4/4          | 0      |
| 6               | <i>in situ</i> | 5   | 1   | 83        | 2/2          | 0      |
| Total: 78       |                | 45  | 33  |           | 26           | 7      |

(+, -) presencia o ausencia de HPV. CaCU: cáncer cervico-uterino. Las muestras HPV (-) y (+), fueron positivas (PCR) para  $\beta$ -globina. Como control positivo para la detección y tipificación de HPV se utilizó DNA de células HeLa (HPV-18), SiHa y CasKi (HPV-16). Las muestras control de raspados cervicales (RC) fueron diagnosticadas clínicamente sin lesión cervical.

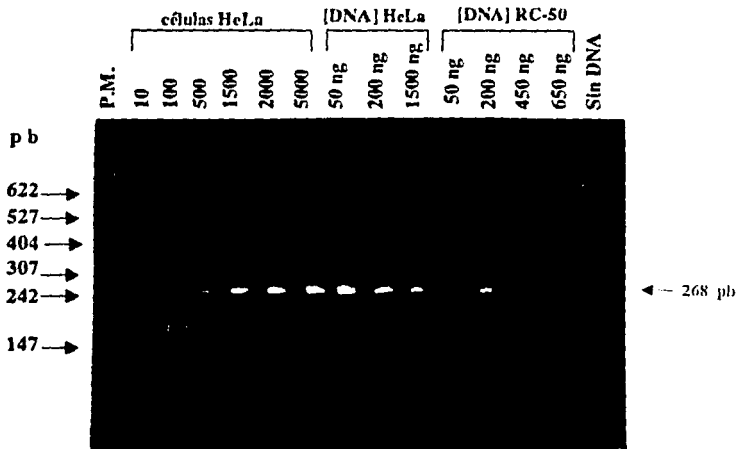
#### 5.4. Inhibición en la reacción de PCR

Los problemas referentes a la amplificación de secuencias virales en algunas muestras de raspados cervicales están asociados, aparentemente, a la presencia de inhibidores que interfieren con la reacción de PCR los cuales quizás actúan directamente sobre la enzima DNA polimerasa o previenen el alineamiento de los "primers". Estudios referentes a este problema han demostrado que diversas sustancias presentes en material clínico tales como sangre, orina, moco, materia fecal, etc. son algunos de los posibles elementos-fluidos del cuerpo que inhiben la reacción de PCR, lo cual se ha demostrado con la amplificación del gen de  $\beta$ -globina [53, 54, 61-68].

La naturaleza del inhibidor no se ha investigado sistemáticamente, pero se ha reportado que es resistente a diferentes tratamientos: ebullición, resistencia a proteinasas, es insoluble en solventes orgánicos. Holodniy y col., [63] estiman que el inhibidor tiene un peso molecular menor a 10 kD y que es un componente endógeno (es decir que no es inducido durante el procesamiento de las muestras). Una estrategia para remover parcialmente este inhibidor consiste en alternar distintos métodos de procesamiento de las muestras y purificación del DNA [54, 61-68]. Actualmente el tratamiento con resinas tipo Chelex-100 ha permitido remover con mayor eficiencia los inhibidores de la reacción del PCR. Singer-Sam y col., [67] postularon que la presencia de la resina Chelex durante la ebullición, captura aquellas sustancias que pudieran intervenir en la reacción del PCR. En estudios previos se utilizó dicha resina, como una probable alternativa para el tratamiento de muestras. Inicialmente, se trabajó con el DNA purificado de una muestra (RC-50) que de antemano se conoce que contiene secuencias virales de HPV y con células completas y DNA purificado de células HeLa como controles. Se procedió a la amplificación de la secuencia correspondientes al gen de  $\beta$ -globina en estas muestras, considerando que al utilizar las muestras que presentarían la inhibición, este gen podría amplificarse al usarse la resina.

Los resultados de amplificación que se obtuvieron utilizando la resina se presentan en la Figura. 10; como se observa en dicha figura, la reacción de amplificación se pudo llevar a

cabo a partir de distintas fuentes de DNA, resultando eficaz la amplificación para dicho gen. Por lo que resulta interesante para estudios posteriores, primero realizar la estandarización del tratamiento con la resina en muestras biológicas (principalmente en aquellas que presenten inhibición), y como segundo paso la amplificación por PCR de un gen conocido como  $\beta$ -globina.



**Figura 10.** Efecto del tratamiento por Chelex-100 (ver materiales y métodos) en la amplificación de  $\beta$ -globina por PCR en células HeLa (10-5000 células), en DNA purificado de HeLa y en una muestra de raspado cervical (RC-50) positivos para HPV. P.M. pBR322/*Msp*I.

## 6.- CONCLUSIONES

- 1.- Se estandarizaron las condiciones de reacción de PCR, para la detección de secuencias de DNA de papilomavirus humano.
- 2.- Se encontró que los parámetros más importantes para obtener alta sensibilidad y especificidad en la reacción de PCR son: concentración mínima de DNA de HPV a detectar, unidades de enzima (Taq DNA polimerasa), número de ciclos de reacción y concentración de iones magnesio.
- 3.- La reacción de PCR permitió determinar la presencia de HPV tanto en células completas como en DNA purificado.
- 4.- Se encontró que la extracción de DNA a partir de muestras biológicas (biopsia y raspados cervicales) es un paso indispensable para la amplificación por PCR.
- 5.- Se determinó la presencia de secuencias de DNA de HPV en muestras de biopsia que presentaban lesiones precancerosas y avanzadas de CaCU, encontrándose frecuentemente al HPV tipo 16 de alto riesgo en las muestras tipificadas.
- 6.- De los estudios de detección de HPV realizados en este trabajo y los reportados para la presencia de anticuerpos (viral y celular), se puede concluir que se encontró una correlación significativa en algunas muestras de biopsias con lesión temprana y avanzada de CaCU.
- 7.- En muestras de raspados cervicales de pacientes controles y en pacientes con lesiones precancerosas y avanzadas de cáncer cérvico-uterino se determinó la presencia del HPV. En las muestras tipificadas se encontró la presencia del virus del papiloma humano tipo 16 y 18, y en algunas ocasiones ambos tipos se detectaron juntos.
- 8.- Se identificó la presencia del HPV tipo 18 en muestras de raspados cervicales en pacientes con citología normal. Es interesante destacar que este tipo de HPV se ha reportado en los casos de cáncer avanzado.

9.- Respecto a los problemas de inhibición en la reacción de PCR, estudios preliminares en este trabajo, indican que el uso de la resina Chelex-100 es un posible candidato para reducir los problemas de inhibición.

Como conclusión general se puede mencionar que se cumplieron los objetivos iniciales del proyecto, aportando una metodología altamente sensible, eficiente y rápida de detección del virus del papiloma humano (HPV), cuya aplicación tiene un impacto importante en la detección de uno de los factores involucrados en el desarrollo del cáncer cervico-uterino.

El hallazgo de secuencias virales y particularmente la presencia de los tipos de alto riesgo en las diferentes etapas del CaCU, puede contribuir de manera significativa al reducir la incidencia y la mortalidad de la enfermedad mediante un diagnóstico y tratamiento eficaz. Aquellas personas sin lesión, a las que se les ha determinado la presencia de HPV, deben someterse a una examinación médica periódica. Como se sabe la mayoría de los casos de CaCU se diagnostican en una fase avanzada y su diagnóstico temprano de infección viral puede prevenir este problema.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- 1.- FIGUEROA A. P., GARIGLIO V. P. y CALDERON J. E. (1990). Infección por el Virus del Papiloma Humano y Cáncer Cérvico-uterino *Infectologia*. Vol. 10(4): 231-240.
- 2.- GARIGLIO P. y RANGEL L. M. (1992). Virus y Cáncer. *Salud Pública de México*. Vol. 34(3) 308-317.
- 3.- ZUR HAUSEN H. (1987). Papillomaviruses in Human Cancer. *Cancer*. Vol. 59(10): 1692-1696.
- 4.- GARCIA-CARRANCA A. y GARIGLIO V. P. (1993). Aspectos Moleculares de los Papilomavirus Humanos y su Relación con el Cáncer Cérvico-uterino. *Rev. Inv. Clin.* Vol. 45: 85-92.
- 5.- GARCIA C. A. (1993). Las Verrugas y el Cáncer Genital. Modelo para la Terapéutica Genética del Cáncer Cervical. *Rev. Fac. Med. UNAM*. Vol. 36(1): 2-5.
- 6.- VOUSDEN K. H. (1991). Human Papillomavirus Transforming Genes. *Virology*. Vol. 2: 307-317.
- 7.- SEEDORF K., OLTERS DORF T., KRAMER G. and ROWEKAMP W. (1987). Identification of Early Proteins of the Human Papillomaviruses Type 16 (HPV 16) and Type 18 (HPV 18) in Cervical Carcinoma Cells. *EMBOJ*. Vol. 6: 139-144.
- 8.- SOUSA R., DOSTATNI N. and YANIV M. (1990). Control of Papillomavirus Gene Expression. *Biochim. Biophys. Acta* Vol. 1032: 19-37.
- 9.- RANGEL L. M., RAMIREZ M., TORROELLA M., PEDROZA A., IBARRA V. and GARIGLIO P. (1994). Multistep Carcinogenesis and Genital Papillomavirus Infection. Implications for Diagnosis and Vaccines. *Archives of Medical Research*. Vol. 25(2): 265-272.
- 10.- ARMBRUSTER-MORALES E., IOSHIMOTO M.L., LEO E. and ZUGAIB M. (1994). Presence of Human Papillomavirus DNA in Amniotic Fluids of Pregnant Women with Cervical Lesions. *Gynecological oncology*. 54: 152-158.
- 11.- TSENG C.-J., LIN C.-Y., WANG R.-L., CHEN L.-J., CHANG Y.-L., HSIEH T.-T., and PAO C. C. (1992). Possible Transplacental Transmission of Human Papillomaviruses. *Am. J. Obstet. Gynecol.* Vol. 166: 35-40.
- 12.- GARIGLIO P. y GARCIA C. A. (1989-90). Papilomavirus Humanos y Cáncer Cérvico Uterino. *Adel. Microbiol. Enf. Infecc.* Vol. 8: 45-58.
- 13.- FIGUEROA A. P. (1990). Diagnóstico de la Infección por el Virus del Papiloma Humano. Mediante Técnicas de Biología Molecular. *Infectologia*. Vol. 10(8): 403-411.
- 14.- HOWLEY P. M. (1987). Papillomaviruses. *Cancer Cells*. Vol. 5: 1-4.
- 15.- GARIGLIO P. (1993). II. Mecanismos Moleculares en Cáncer Cérvico-uterino. Influencia de Oncogenes Virales, Celulares y Anti-oncogenes. *Rev. Fac. Med. UNAM*. Vol. 36(1): 6-12.
- 16.- SHAH V. K. (1992). Papillomaviruses. *Laboratory Diagnosis of Viral Infections*. Marcel Dekker Inc. 591-612.

- 17.- OCADIZ R., SAUCEDA R., CRUZ M., GRAEF M. A. and GARIGLIO P. (1987). High Correlation Between Molecular Alterations of *c-myc* Oncogene and Carcinoma of the Uterine Cervix. *Cancer Research*. Vol. 47: 4173-4177.
- 18.- GARIGLIO P., OCADIZ R. and SAUCEDA R. (1987). Human Papillomavirus DNA Sequences and *c-myc* Oncogene Alterations in Uterine Cervix Carcinoma. *Cancer Cell*. Vol. 5: 343-348.
- 19.- ASKONAS B. A., MOSS B., TORRIGIANI G. and GORINI S. (1989). The Immune Response to Viral Infections. *Adv. in Exp. Medicine and Biology*. Vol. 257: 169-186.
- 20.- SMOTKIN D. and WETTSTEIN F. O. (1986). Transcription of Human Papillomavirus Type 16 Early Genes in a Cervical Cancer and a Cervical Derived Cell Line and Identification of the E7 Protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 83: 4680-4684.
- 21.- CHOU-CHI H., GILDEN R. V., SHOWALTER S. D. and SHAH K. V. (1988). Identification of the Human Papillomavirus E2 Protein in Genital Tract Tissue. *J. Virol.* Vol. 62(2): 606-609.
- 22.- DILLNER J. (1990). Mapping of Linear Epitopes of Human Papillomavirus Type 16: The E1, E2, E4, E5, E6 and E7 Open Reading Frames. *Int. J. Cancer*. Vol. 46: 703-711.
- 23.- ANDROPHY E. J., HUBBERT N. L., SCHILLER J. T. and LOWY D. R. (1987). Identification of the HPV-16 E6 Protein from Transformed Mouse Cells and Human Cervical Carcinoma Cell Lines. *EMBO J.* Vol. 6(4): 989-992.
- 24.- LEACHANACHAI P., BANKS L., MOREAU F. and MATLASHEWSKI G. (1992). The E5 Gene from Human Papillomavirus Type 16 is an Oncogene which Enhances Growth Factor-mediated Signal Transduction to the Nucleus. *Oncogene*. Vol. 7: 19-25.
- 25.- BARRERA S. H. A., ORTIZ L. R., ROJAS M. A. y RESENDEZ P. D. (1993). Reacción en Cadena de la Polimerasa. Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo*. Enero-Febrero: 50-59.
- 26.- KANDA T., ONDA T., ZANMA S., YASUGI T., FURUNO A., WATANABE S., KAWANA T., SUGASE M., UEDA K., SONODA T., SUZUKI S., YAMASHIRO T., YOSHIKAWA H. and YOSHIKE K. (1992). Independent Association of Antibodies against Human Papillomavirus Type 16 E1/E4 and E7 Proteins with Cervical Cancer. *Virology*. Vol. 190: 724-732.
- 27.- ERLICH A. H. (1989). PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. *Stockton Press*. 1-249.
- 28.- SAIKI K. R., GELFAND H. D., STOFFEL S., SCHARF J. S., HIGUCHI R., HORN T. G., MULLIS B. K. and ERLICH A. H. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. Vol. 239: 487-491.
- 29.- WILCZYNSKI S. P., ORT M., COOK N., LIAO S. Y. and IFTNER T. (1993). Human Papillomavirus Type 6 in Squamous Cell Carcinoma of the Bladder and Cervix. *Human Pathology*. Vol. 24(1): 96-102.
- 30.- MANOS M., LEE K., GREER C., WALDMAN J., KIVIAT N., HOLMES K. and WHEELER C. (1990). Looking for Human Papillomavirus Type 16 by PCR. *The Lancet*. March 24: 734.

- 31.- ZUR HAUSEN H. (1989). Papillomavirus in Anogenital Cancer as a Model to Understad the Role of Viruses in Human Cancer. *Cancer Research*. Vol. 49: 4677-4681.
- 32.- YOSHIKAWA H., KAWANA T., KITAGAWA K., MIZUNO M., YOSHIKURA H. and IWAMOTO A. (1990). Amplification and Typing of Multiple Cervical Cancer-associated Human Papillomavirus DNAs Using a Single Pair of Primers. *Int. J. Cancer*. Vol. 45: 990-992.
- 33.- CHEN BI-FEN and CLEJAN S. (1993). Rapid Preparation of Tissue DNA from Paraffin-embedded Blocks and Analysis by Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. Vol. 41(5): 765-768.
- 34.- SUCHANKOVA A., RITTEROVA L., KREMAR M., KRCHNAK V., VAGNER J., JOCHMUS I., GISSMANN L., KANKA J., and VONKA V. (1991). Comparison of ELISA and Western Blotting for Human Papillomavirus type 16 E7 antibody determination. *Journal of General Virology*. Vol. 72: 2577-2581.
- 35.- YOSHIKAWA H., KAWANA T., KITAGAWA K., MIZUNO M., YOSHIKURA H., and IWAMOTO A. (1991). Detection and Typing of Multiple Genital Human Papillomaviruses by DNA Amplification with Consensus Primers. *Jpn. J. Cancer Res*. Vol. 82: 524-531.
- 36.- KAWASAKI S. E. (1990). Sample Preparation from Blood, Cells and Other Fluids. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc. 147-157.
- 37.- MANOS M. M. and TING Y. (1990). Detection and Typing of Genital Human Papillomaviruses. *PCR Protocols: A guide to methods and applications*. Academic Press, Inc. 356-367.
- 38.- SAMBROOK J., FRITSCH E. F. and MANIATIS T. (1989). Molecular Cloning. *A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2nd Ed. 9.16-9.19, B.16.
- 39.- VAN DEN BRULE J. C. A., MEIJER L. M. C., BAKEL V. KENEMANS P. and WALBOOMERS M. M. J. (1990). Rapid Detection of Human Papillomavirus un Cervical Scrapes by Combined General Primer-Mediated and Type-Specific Polymerase Chain Reaction. *J. of Clin. Microbiology*. Vol. 28(12): 2739-2743.
- 40.- CONTORNI M. and LEONCINI P. (1993). Typing of Human Papillomavirus DNAs by Restriction Endonuclease Mapping of the PCR Products. *J. of Virological Methods*. Vol. 41: 29-36.
- 41.- GUERRERO E., DANIEL W. R., BOSCH X. F., CASTELLSAGUE X., MUÑOZ S N., GILI M., VILADIU P., NAVARRO C., ZUBIRI L.M., ASCUNCE N., GONZALEZ C. L., TAFUR L., IZARZUGAZA I. and SHAH V. K. (1992). Comparison of ViraPap Southern Hybridization and Polymerase Chain Reaction Methods for Human Papillomavirus Identification in an Epidemiological Investigation of Cervical Cancer. *J. of Clin. Microbiology*. Vol. 30(11): 2951-2959.
- 42.- SCHIFFMAN H. M., BAUER M. H., LORINCZ T. A., MANOS M. M., BYRNE C. J., GLASS G. A., CADELL M. D. and HOWLEY M. P. (1991). Comparison of Southern Blot Hybridization and Polymerase Chain Reaction Methods for the Detection of Human Papillomavirus DNA. *J. of Clin. Microbiology*. Vol. 29(3): 573-577.
- 43.- NUOVO J.G., MORITZ J., WALSH L. L., MACCONNELL P. (1992). Predictive Value of Human Papillomavirus DNA Detection by Filter Hybridization and Polymerase Chain Reaction in Women with Negative Results of Colposcopic Examination. *Anatomic Pathology*. Vol. 98(5): 489-492.



- 44.- SNIJDERS J. F. P., VAN DEN BRULE J. C. A., SCHRIJNEMAKERS F. J. H. SNOW G., MEIJER J. L. M. C., and WALBOOMERS M. M. F. (1990). The Use of General Primers in the Polymerase Chain Reaction Permits the Detection of a Broad Spectrum of Human Papillomavirus Genotypes. *J. of General Virol.* Vol. 71: 173-181.
- 45.- SHIBATA K. D., ARNHEIN N. and MARTIN J. (1988). Detection of Human Papilloma Virus in Paraffin-embedded Tissue using the Polymerase Chain Reaction. *J. Exp. Med.* Vol. 167: 225-230.
- 46.- DAS B. C., SHARMA J. K., GOPALAKRISHNA V. and LUTHRA K. (1992). Analysis by Polymerase Chain Reaction of the Physical State of Human Papillomavirus Type 16 DNA in Cervical Preneoplastic and Neoplastic Lesions. *J. of General Virol.* Vol. 73: 2327-2336.
- 47.- SMITS L. H., TIEBEN M. L., TJONG-A-HUNG P. S., JEBBINK F. M., MINNAAR P. R., JANSEN L. C. and SCHEGGET T. J. (1992). Detection and Typing of Human Papillomavirus Present in Fixed and Stained Archival Cervical Smears by a Consensus Polymerase Chain Reaction and Direct Sequence Analysis Allow the Identification of a Broad Spectrum of Human Papillomavirus Types. *J. of General Virol.* Vol. 73: 3263-3268.
- 48.- CUZICK J., TERRY G., HO L., HOLLINGWORTH T. and ANDERSON M. (1994). Type-specific Human Papillomavirus DNA in Abnormal Smears as a Predictor of High-grade Cervical Intraepithelial Neoplasia. *Br. J. Cancer.* Vol. 69: 167-171.
- 49.- GRIFFIN N. R., BEVAAN I. S., LEWIS F. A., WELLS M. and YOUNG L. S. (1990). Demonstration of Multiple HPV Types in Normal Cervix and in Cervical Squamous Cell Carcinoma Using the Polymerase Chain Reaction on Paraffin Wax Embedded Material. *J. Clin. Pathol.* Vol. 43: 52-56.
- 50.- CHEN S., TABRIZI S. N., FAIRLEY C. K., BORG A. J. and GARLAND S. M. (1994). Simultaneous Detection and Typing Strategy for Human Papillomaviruses Based on PCR and Restriction Endonuclease Mapping. *BioTechniques.* Vol. 17(1): 138-142.
- 51.- RAKOCZY P., STERRETT G., KULSKI J., WHITAKER D., HUTCHINSON L., MACKENZIE J. and PIXLEY E. (1990). Time Trends in the Prevalence of Human Papillomavirus Infections in Archival Papanicolaou Smears: Analysis by cytology, DNA hybridization, and Polymerase Chain Reaction. *J. of Med. Virology.* Vol. 32: 10-17.
- 52.- BRANDSMA J., BURK D. R., LANCASTER D. W., PFISTER H. and SCHIFFMAN H. M. (1989). Inter-Laboratory Variation as an Explanation for Varying Prevalence Estimates of Human Papillomavirus Infection. *Int. J. Cancer.* Vol. 43: 260-262.
- 53.- KURZ J., MITRA K., ADAM R., MIAO X., MACKAY J. S., ISA N. N., COOMBS D. H., and KRAUSE M. O. (1993). PCR Detection and Typing of Genital Papillomavirus in a New Brunswick Population. *Int. J. Cancer.* Vol. 55: 602-608.
- 54.- PRUSSIA P. R., SCHEGGET T. J. and SMITH H. L. (1993). Detection of Oncogenic HPV DNA by a Consensus Polymerase Chain Reaction Methods in Genital Carcinomas in Twenty Women in Barbados. *W. I. Med. J.* Vol. 42: 144-146.
- 55.- KINOSHITA M., KATSURAGI K., SHIN S. and AONO T. (1993). Amplification and Point-mutation Alterations of Oncogenes in Patients with Cervical Cancer Associated Human Papillomavirus. *Biomedical Research.* Vol. 14(6): 403-410.

- 56.- RIOU G. F., BARROIS M., DUTRONQUAY V. and ORTH G. (1985). Presence of Papillomavirus DNA Sequences. Amplification of *c-myc* and *c-Ha-ras* Oncogenes and Enhanced Expression of *c-myc* in Carcinomas of the Uterine Cervix. *Papillomaviruses: Molecular and Clinical Aspects*. Alan R. Liss, Inc. 47-56.
- 57.- ERLICH A. H. (1993). How to optimize, Modify, and/or Troubleshoot PCR Reactions. *Clinical immunology newsletter*. Vol. 13(12): 163-166.
- 58.- AUSUBEL F. M., BRENT R., KINGSTON R. E., MOORE D. D., SMITH J.A., SEIDMAN J. G. AND STRUHL K. (1990). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Assoc. and Willey-Interscience, NewYork. Vol. 2. p.A. 1.5.
- 59.- WALSH S. P., METZGER A. D. and HIGUCHI R. (1991). Chelex 100 as a Medium for Simple Extraction of DNA for PCR-Base Typing from Forensic Material. *BioTechniques*. Vol. 10(4): 506-513.
- 60.- MORRISON A. B. E., GOLDBERG L. G., KADISH S. A. and BURK D. R. (1992). Polymerase Chain Reaction Detection of Human Papillomavirus: Quantitation May Improve Clinical Utility. *J. of Clin. Microbiology*. Vol. 30(10): 2539-2543.
- 61.- FRANCHIS de R., CROSS N. C. P., FOULKES N. S. and COX T. M. (1988). A Potent Inhibitor of *Taq* Polymerase Copurifies with Human Genomic DNA. *Nucleic Acids Research*. Vol. 16(12): 10355.
- 62.- WANG J-T., WANG T-H., SHUE J-C., LIN S-M., LIN J-T. and CHEN D-S. (1992). Effects of Anticoagulants and Storage of Blood Samples on Efficacy of the Polymerase Chain Reaction Assay for Hepatitis C Virus. *J. of Clin. Microbiology*. Vol. 30(3): 750-753.
- 63.- HOLODNIY M., KIM S., KATZENSTEIN D., KONRAD M., GROVES E. and MERIGAN C. T. (1991). Inhibition of Human Immunodeficiency by Heparin. *J. of Clin. Microbiology*. Vol. 29(4): 676-679.
- 64.- KHAN G., KANGRO H. O., COATES P. J. and BEATH R. B. (1991). Inhibitory Effects of Urine on the Polymerase Chain Reaction for Cytomegalovirus DNA. *J. Clin. Pathol.* Vol. 44: 360-365.
- 65.- THOMAS M. G., HESSE S. A., AL-MAHDAWI S., BUI T. D., MONIZ C. F. and FARZANEH F. (1994) A Reliable Method for Co-Purifying PCR Inhibitors from Ancient DNA. *BioTechniques*. Vol. 16(2): 232-233.
- 66.- AN S. F. and FLEMING K. A. (1991). Removal of inhibitor(s) of the Polymerase Chain Reaction from formalin Fixed, Paraffin Wax Embedded Tissue. *J. Clin. Pathol.* Vol. 44: 924-927.
- 67.- SINGER-SAM J., TANGUAY L. R. and RIGGS D. A. (1989). Use of Chelex to Improve the PCR Signal from a Small Number of Cell. *AMPLIFICATION: A forum for PCR users*. Sep. Issue 3: 11.
- 68.- IRALU V. J., SRITHARAN K. V., PIECIAK S. W., WIRTH F. D., MAGUIRE H. J. and BARKER H. R. (1993). Diagnosis of *Mycobacterium avium* Bacteremia by Polymerase Chain Reaction. *J. of Clin. Microbiology*. Vol. 31(7): 1811-1814.