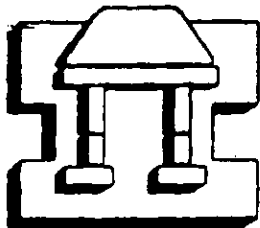


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA

IDENTIFICACION DE DNA DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO (VPH) EN LESIONES PRE-CANCEROSAS Y CANCEROSAS DE CERVIX

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
JESUS PABLO GOMEZ ISLAS



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. RAFAEL JIMENEZ FLORES

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEXICO

2000



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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



A mi primo:

Lic. Juan José García López.

Agradezco a mis Padres:

Jesús Gómez Aguilera y Guadalupe Islas Peña, por darme la oportunidad de vivir, su apoyo incondicional y su amistad.

A mis esposa Sandra y mi hijo Rodrigo, por estar siempre conmigo.

A mis hermanos: Imelda, José Manuel y Luis Ramón por estar siempre unidos.

A toda mi familia con la que he pasado momentos muy agradables y momentos muy difíciles.

A mis amigos tanto de la ENEP Iztacala como del CINVESTAV.

A mi asesor M. en C. J. Rafael Jiménez Flores por su ayuda profesional y gran amistad

A mi gran amiga Xochitl González Cid por su apoyo técnico y compañía.

CONTENIDO

Lista de abreviaturas	1
Lista de figuras	2
Resumen	3
Introducción	4
Biología molecular del VPH	5
Región larga de control (LCR)	6
Genes tempranos (E)	7
Genes tardíos (L)	10
Control de transcripción	10
Infección viral e integración al genoma huésped	11
Neoplasia intraepitelial cervical (NIC), precursor del Cáncer Cérvico-uterino (CaCu).	13
Oncogenes y Anti-oncogenes	14
Contribución de E7 y E6 en la carcinogénesis	15
Aspectos inmunológicos	17
Objetivos	20
Justificación	21
Antecedentes	22
Material y Métodos	24
Muestras	24
Obtención de DNA	24
Identificación de VPH	25
Tipificación de VPH 16	26
Tipificación de VPH 18	27
Preparación de las reacciones	27
Preparación de los resultados	28
Resultados	29
Análisis y discusión	39
Conclusiones	41
Bibliografía	42

LISTA DE ABREVIATURAS

EBV	Virus Epstein-Bar.
T(HTLV-1)	Virus de la Leucemia Humana de Células T.
VPH	Virus del Papiloma Humano.
CaCu	Cáncer Cérvico-Uterino.
ORF	Marcos de Lectura Abierta.
E	Genes de Expresión Temprana.
L	Genes de Expresión Tardía.
LCR	Región Larga de Control.
Kda	Kilodaltons.
aa	Aminoácidos.
SV40	Virus 40 del Simio.
NLS	Secuencia de Localización Nuclear.
pb	Pares de Bases.
NIC	Neoplasia Intraepitelial Cervical.
NF-1	Factor Nuclear 1.
AP-1	Proteína Activadora 1.
c-myc	Oncogen Celular myc.
c-ras	Oncogen Celular ras.
p53	Proteína Antioncogénica de 53 Kilodaltons.
pRb	Proteína Antioncogénica de Retinoblastoma
Ab	Anticuerpos.
Ag	Antígenos.
CPA	Célula Presentadora de los Antígenos.
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad.
HLA	Antígenos de Leucocitos Humanos.
TCR	Receptor de Linfocitos T.
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intercelular tipo 1.
LFA-3	Antígeno de Función Linfocitaria-3.
NK	Células Asesinas Naturales.
TAP's	Molécula Asociada al Transporte de Péptidos.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.

LISTA DE FIGURAS

Figura No.		Página
1	Genoma del VPH tipo 16.	6
2	Región Larga de Control.	7
3	Integración del VPH al Genoma Celular.	12
4	Diferentes Estadios en la Progresión del CaCu.	13
5	Función de p53 y Alteración en CaCu.	16
6	Función de pRb y Alteración en CaCu.	17
7	Amplificación del gen constitutivo beta-globina.	33
8	Amplificación del gen L1 mediante oligonucleótidos L1C1/C2.	35
9	Amplificación del gen L1 mediante oligonucleótidos MY09/11.	36
10	Amplificación oligo-específica del gen E6 de VPH tipo 16.	37
11	Amplificación oligo-específica del gen E6 de VPH tipo 18.	38

TABLAS

Tabla No.		Página
1	Tipos de VPH y alteraciones específicas	5
2	Diagnóstico molecular	29

GRÁFICAS

Gráfica No.		Página
1	Diagnóstico Clínico	30
2	Muestras positivas a VPH con oligonucleótidos L1C1/C2.	30
3	Muestras positivas a VPH con oligonucleótidos MY09/11.	31
4	Total de muestras positivas	31
5	Número de muestras positivas para VPH tipo 16.	32
6	Número de muestras positivas para VPH tipo 18.	32

RESUMEN

Estudios epidemiológicos han demostrado la asociación de infección por Virus del Papiloma Humano (VPH) y Cáncer Cérvico-uterino (CaCu), de tal forma que estos virus han sido clasificados de acuerdo a su patogenicidad en virus de bajo riesgo, riesgo intermedio y alto riesgo. En México existe desde hace 20 años el Programa Nacional de Detección Oportuna del Cáncer, sin embargo su impacto sobre la mortalidad por CaCu ha sido nulo debido a las fallas en el diagnóstico oportuno y preciso. Por esta razón es necesario mejorar los métodos en el diagnóstico. En este trabajo identificamos la infección por VPH mediante la tecnología de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando dos juegos de oligonucleótidos que identifican 6 tipos de VPH y dos juegos más específicos para VPH tipo 16 y 18. Se trabajó con una población de 60 mujeres que acudieron al hospital de la Mujer y CMN 20 de noviembre con diagnóstico clínico de infección por VPH en diferentes estadios. Los resultados muestran que 25 de los 60 casos estudiados fueron positivos para VPH lo que representa el 41.6%, de estos, 23 (92%) fueron positivos para VPH tipo 16, solo una muestra fue positiva para el VPH tipo 18 y una más que corresponde a alguno de los tipos 6,11,31,33,36. del total de la muestra 17 pacientes tenían lesiones tempranas y 41 lesiones avanzadas. En estos grupos 14 y 7 pacientes habían sido histerectomizadas respectivamente, previo al estudio., de tal manera que la biopsia estudiada se tomó de lesiones acetobalncas positivas en el fondo de saco o paredes vaginales, situación que podría explicar la frecuencia encontrada. Sin embargo concluimos que la presencia de VPH se incrementa con la severidad de la lesión: NIC I 14%, NIC II 20%, NIC III o CaCu in situ 35% y finalmente CaCu 66%, además que el VPH tipo 16 es más frecuente que el tipo 18.

INTRODUCCIÓN

El cáncer deriva de una sola célula que fue drásticamente alterada en su patrimonio genético (Cavenee, et al. 1995). Su característica fundamental es la pérdida del control de su división dando como consecuencia su inmortalización, además posee la capacidad de diseminación, implantando entonces tumores lejos de su origen (Metástasis). Se origina por agentes físicos, químicos o biológicos que pueden causar aberraciones cromosómicas, acumulación de mutaciones somáticas y rearrreglo genético, alterando antioncogenes y protoncogenes (Cavenee, et al. 1995. Gariglio, 1995). En los últimos años se ha observado que la génesis del cáncer también puede deberse a la inserción de material genético nuevo como consecuencia de la infección por virus oncogénicos (Gariglio, et al. 1987. Ludlow, et al. 1993. Vousden, et al. 1993). Estudios epidemiológicos han indicado que algunos virus pueden contribuir al desarrollo de tumores humanos usando diferentes mecanismos que van desde la estimulación de la proliferación celular, alteración funcional de proteínas específicas hasta la inmunosupresión. El virus Epstein-Barr (EBV), el de hepatitis B, el virus de leucemia humana de células T (HTLV-1) y varios tipos de virus del papiloma humano (VPH), se asocian consistentemente a cánceres específicos. Sin embargo, la sola infección por estos virus no es suficiente para producir un tumor, se requiere la participación de las alteraciones ya mencionadas y una deficiente respuesta inmune (Gariglio, 1995). La infección por virus del papiloma humano (VPH) está asociado a cáncer cervico-uterino (CaCu) en aproximadamente el 90-95% de los casos (Howley, et al 1991. Burger, et al. 1996. Iwasawa, et al. 1996. Stern 1996).

Los VPH han sido asociados con un número de enfermedades humanas, incluyendo epidermodisplasia verruciforme, neoplasias anogenitales, faríngeas, orales y los carcinomas cervicales (Stern, 1996). De los 100 tipos de VPH identificados hasta ahora, por lo menos 40 se han encontrado en la mucosa anogenital. Dichos VPH suelen clasificarse en tres grupos diferentes según su grado de patogenicidad: VPH 6,11,42,43 y 44 los cuales se detectan en lesiones benignas tales como condilomas; VPH 31,33,51,52 y 58 se encuentran comúnmente en lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado y VPH 16,18,45 y 56 son los tipos predominantes en lesiones intraepiteliales escamosas de alto grado y en carcinoma invasor (Iwasawa, et al. 1996) (tabla 1). Mundialmente el cáncer cérvico-uterino es el quinto cáncer más común, con aproximadamente 500,000 nuevos casos diagnosticados cada año y es la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres (Stern, 1996). La enfermedad neoplásica más frecuente en la población femenina de los países subdesarrollados es el cáncer cérvico-uterino (García-Carranca y Gariglio 1993).

Tipo de Papilomavirus Humano	Tejido Infectado	Asociación Clínica	Riesgo de Transformación
1,2,3,4,10,28,29.	Piel	Verrugas palmares y plantares	Bajo
7.	Piel	Verrugas de Butcher's	Bajo
26,27,49.	Piel	Verrugas en pacientes inmuno-comprometidos.	Bajo
3,5,8,9,12,14,15,17,19,21,22,23,24,25,36,47.	Piel	Epidermodisplasia verruciforme asociada con verrugas benignas y carcinoma celular escamoso.	Bajo o Alto
37,38,41,48,60.	Piel	Querotoacantoma, melanoma y carcinomas celular escamoso.	Bajo o Alto
13,32,57.	Mucosa Oral	Hiperplasia oral	Bajo
6,11,42,43,44.	Mucosa genital	Condiloma acuminado	Bajo
31,33,35,51,52,58,61.	Mucosa genital	Neoplasia Intraepitelial del cérvix	Intermedio
16,18,30,34,39,40,45,53,54,55,56,59.	Mucosa genital	Neoplasia Intraepitelial, Adenocarcinoma y Carcinoma celular escamoso.	Alto

Tabla 1.- Diferentes tipos de VPH y su relación con alteraciones específicas en humanos. (Ulrike, 1996).

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VPH.

El virus del papiloma humano tiene una estructura icosaédrica formada de 72 capsómeros, un tamaño aproximado de 52-55 nm, y pertenece a la familia Papovaviridae (Ulrike, 1996). El genoma de los VPH es una doble cadena de DNA circular y superenrollada, su peso molecular estimado es de 5×10^6 Da, y contiene aproximadamente 8000 pares de bases. En los viriones, el DNA se encuentra compactado con histonas de origen celular, formando la cromatina viral (zur Hausen, 1980). Se han descrito de 8 a 10 genes en una sola cadena de DNA, indicando que la transcripción es unidireccional. Los genomas de los diferentes tipos virales presentan una estructura básica muy similar, con homología de secuencia entre ellos que van de moderada (45%) a alta (85%). Se han identificado marcos de lectura abierta (ORF), algunos de ellos traslapados entre sí. De acuerdo a la ubicación de su expresión durante la infección están organizados en regiones de expresión temprana (E) y tardía (L). La primera codifica para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2) y transformación celular (E4, E5, E6 y E7); la segunda codifica proteínas de la cápside (L1 y L2). El genoma contiene una región larga de control (LCR) no codificante de aproximadamente 1000 pb, en la que se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de la replicación (García-Carranca y Gariglio, 1993) (fig 1).

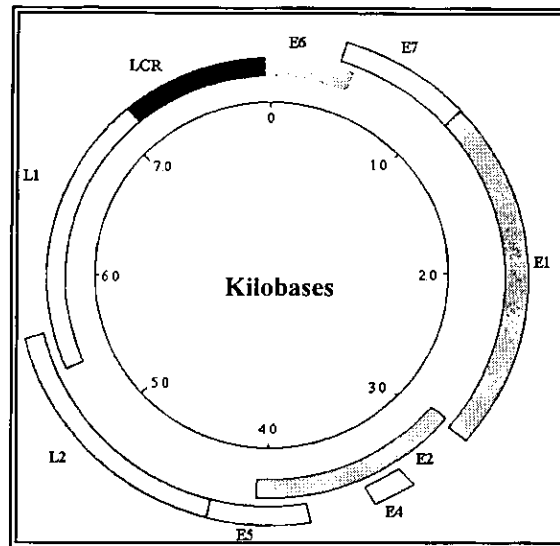


Fig 1.- Organización genómica del VPH 16, se muestran los marcos de lectura de los genes tempranos (E), genes tardíos (L) y la región larga de control (LCR) (Park, et al 1995).

REGIÓN LARGA DE CONTROL (LCR).

Además del origen de la replicación, en esta región también se encuentran los elementos que regulan la expresión de los oncogenes virales (promotor e intensificador), entre ellos encontramos la caja TATA y CAAT, por lo que se dice que tiene los elementos *in cis* para la regulación de la transcripción, cuenta con secuencias de DNA que son blanco de factores proteicos virales y celulares, posee entonces sitios de unión para la proteína viral E2 que funciona como activador y represor de la transcripción viral (García-Carranca y Gariglio, 1993). Posee un intensificador tejido-específico el cual es activado en células epiteliales de origen humano, sin embargo esta actividad es sólo dependiente de factores transcripcionales celulares y no de proteínas virales. Se han descrito sitios de unión para otros factores transcripcionales celulares los cuales juegan un papel funcional en la regulación transcripcional de los VPH, notablemente se pueden mencionar: NF1, SP1, AP1, el receptor de glucocorticoides, así como sitios de unión para Oct-1 y YY1 que son otros factores celulares que interfieren de manera negativa en la expresión de RNAs tempranos (Thierry F. 1996) (fig 2).

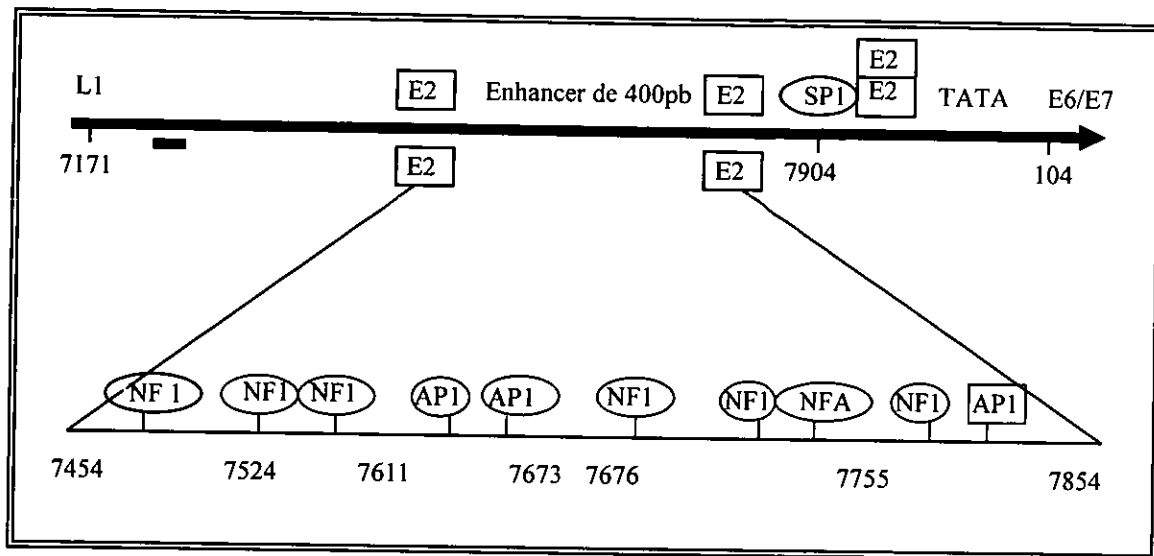


Fig 2.- Región Larga de Control (LCR) del VPH 16. El fragmento superior e inferior (región de enhancer) muestran las posiciones relativas de los sitios de unión a factores de transcripción tanto celulares como virales (Chong et al. 1991).

GENES TEMPRANOS (E).

PROTEÍNA E4. De las proteínas codificadas por el genoma del VPH, la proteína E4 es expresada como una proteína tardía de la región temprana del genoma. El gen que codifica para esta proteína se encuentra dentro del marco de lectura de E2 y parece no tener una función en la transformación celular. Sin embargo se ha observado que E4 puede influenciar en el número de copias episomales virales, quizá por interferir con factores celulares los cuales normalmente previenen la replicación viral en células de la capa basal. También se ha observado que E4 altera la queratina de los epitelios, así el virus puede impedir la formación de una capa altamente cornificada facilitando entonces la liberación de partículas virales. Tal vez el papel más probable de la proteína E4 en la naturaleza de los tumores es modificar la fisiología de la célula infectada así como favorecer el ciclo de vida del virus. E4 debería ser considerada una proteína tardía, ya que su expresión es primero detectada en células de la capa parabasal en las cuales es muy abundante, coincidiendo con el principio de la replicación del DNA viral. Aunque los factores que regulan la expresión de E4 son desconocidos, es detectada más frecuentemente en lesiones que muestran alto número de copias de VPH o altos niveles de expresión de L1 y L2 (Doorbar. 1996, Stern. 1996).

PROTEÍNA E5. Esta ha sido localizada en aparato de golgi, retículo endoplásmico y en la membrana nuclear de células infectadas, se ha observado que es capaz de unirse a ATPasas vacuolares deteriorando su actividad y disminuyendo la degradación de receptores para factores de crecimiento en la superficie celular, aumenta la actividad mitótica, interfiere con el procesamiento de los antígenos e interrumpe las uniones celulares gap impidiendo entonces la comunicación celular (Stern, 1996). Estos datos sugieren que la proteína E5 actúa en una manera multifuncional, tiene por tanto un potencial para inducir mitosis el cual es amplificado en la presencia de ciertos factores de crecimiento. En lesiones de bajo grado puede estimular la señal de receptores a factores de crecimiento en respuesta a un bajo nivel de activación de ligandos la cual puede llevar a un incremento en la actividad mitótica y aumentar la expresión de genes tempranos virales. La localización de E5 en la membrana celular implica que esta se relaciona con un conjunto totalmente diferente de factores celulares a los relacionados con los oncogenes E6 y E7 (Banks, 1996).

PROTEÍNA E1 Y REPLICACIÓN VIRAL. Normalmente en células infectadas, el genoma de papilomavirus existe como un mini-cromosoma con una estructura cromática idéntica al DNA celular. La replicación viral tiene lugar en los núcleos de células y depende de la maquinaria nuclear celular. La principal proteína de replicación viral es E1 la cual es altamente conservada entre los papilomavirus. Dos regiones pueden ser distinguidas dentro de su secuencia primaria, la región C-terminal conteniendo varias secuencias con homología al Ag T de SV40, tales como, un sitio de unión a ATP, dominios de ATPasa y helicasa, así como un dominio N-terminal divergente. Sin embargo, la replicación del DNA de VPH también requiere de un regulador transcripcional E2 (Thierry, 1996). Ya que la secuencia mínima de replicación contiene sitios de unión para E2 y E1, se ha observado que E1 no puede unirse eficientemente al DNA por lo que se sugiere que la proteína E2 dirige a la proteína E1 hacia el origen de la replicación. Se plantea un mecanismo de regulación para la replicación, donde la proteína completa E2 forma un complejo con E1. Es posible que las proteínas E2 incompletas actúen como represores compitiendo con la proteína E2 normal (Thierry, 1996). Como la proteína E1 se une preferentemente a E2 desfosforilada, la fosforilación podría modular la interacción de E1 y E2 (zur Hausen, 1991). También se piensa que esta interacción puede jugar un papel funcional en el control de la transcripción mediada por E2 (Thierry, 1996).

PROTEÍNA E6. El marco de lectura del gen E6 codifica para una proteína de 158 aa, tiene una localización tanto nuclear como citoplasmática en las células infectadas, se une inespecíficamente a DNA de doble cadena, une zinc a través de dos dominios de cisteína conservados en su extremo C-terminal. Esta característica también está presente en otras proteínas que se unen al DNA (dedos de zinc) por lo tanto se propone que es capaz de activar la transcripción de varios promotores que contengan caja TATA (Vousden 1993).

Esta oncoproteína se une al igual que el Ag T de SV40 y la proteína E1-b de adenovirus 5 al producto del gen supresor de tumor *p53*. Aunque estas oncoproteínas de virus tumorales de DNA se unen a *p53* la consecuencia de esta interacción es muy diferente. Al interaccionar con el Ag T de SV40 o con E1-b de adenovirus-5 se incrementa la vida media de la proteína, contrario a este efecto las células transformadas por VPH contienen muy bajos niveles de *p53* (Howley 1991).

PROTEÍNA E7. Esta es una pequeña fosfoproteína de 98 aa, tiene una localización tanto nuclear como citoplasmática (García-Carranca, Gariglio, 1993. Croock, 1996). Al igual que E6 tiene la capacidad de unir zinc a través de un dominio de cisteína en su extremo C-terminal. Tiene la capacidad de extender la vida de las células cooperando con otras oncoproteínas tal como *ras*, activa la síntesis de DNA, y modula la transcripción de ciertos promotores. La región de secuencia similar entre E7 y E1A de adenovirus son también compartidas con el Ag T de SV40. Estas regiones conservadas participan en la unión de un número importante de proteínas celulares reguladoras, incluyendo el producto del gen supresor de tumor retinoblastoma *pRB*. El dominio N-terminal de la proteína E7 es altamente conservada entre los VPH de bajo y alto riesgo. La proteína E7 de todos estos VPH genitales es capaz de formar un complejo con *pRB*, aunque hay una diferencia significativa en la afinidad de estos complejos. La proteína E7 de VPH de bajo grado tiene una afinidad 10 veces menor a la afinidad en los VPH de alto riesgo (Howley, 1991).

PROTEÍNA E2. El producto completo del marco de lectura de E2 es una proteína de 50 kDa, la cual posee una estructura conservada de tres dominios. La proteína E2 completa puede funcionar como un trans-activador o un represor, dependiendo de la localización de los sitios de unión a E2 en el promotor. Posee dominios funcionales los cuales son bien conservados entre las proteínas de los diferentes VPH. Uno de los dominios está localizado en el extremo N-terminal, con una longitud de 200 aa y una función de trans-activación. El otro dominio con una longitud de entre 90-100 aa está en el extremo C-terminal, es esencial para la dimerización y la unión al DNA. Una región flexible llamada región de bisagra separa el dominio trans-activador del dominio de unión al DNA, esta región varía entre los tipos virales por su tamaño y su secuencia de aa, se cree que posee una función meramente estructural dando unión y flexibilidad a los otros dominios (Dowhanick, et al 1995).

GENES TARDIOS (L).

PROTEÍNA L1 y L2. Todos los VPH tienen dos marcos de lectura tardíos, uno designado L1 que codifica para la más abundante de las proteínas estructurales con un peso molecular de aproximadamente 54-58 kDa. El segundo designado como L2, codifica para una proteína menos abundante de peso molecular entre los 63-78 kDa. Ambas proteínas son sintetizadas en el citoplasma de queratinocitos diferenciados, esta expresión no aparenta estar asociada con un estado particular de diferenciación celular. Poco después de la síntesis, son transportadas al núcleo donde se lleva a cabo el ensamblaje viral. El transporte de las proteínas L1 y L2 al núcleo es mediado por una señal de localización nuclear (NLS). Típicamente la NLS es una secuencia corta de 8 a 10 aa conteniendo una alta proporción de cargas positivas (lisinas y argininas). Imágenes de microscopía electrónica de la cápside de VPH muestran que la proteína L1 forma capsómeros pentaméricos que incluyen un agujero central en cada uno de ellos. En las resoluciones de estas imágenes, la localización de la proteína L2 no puede ser claramente definida. Sin embargo se han propuesto una serie de funciones para esta proteína: Forma un complejo L1-L2 en el citoplasma participando entonces en el transporte de L1 al núcleo. Ambas L1 y L2 tienen su NLS localizado en el extremo C-terminal, cuando la secuencia NLS de L1 es removida, la molécula está dispersa en toda la célula, pero después de co-expresarla con L2, la molécula L1 alterada es dirigida nuevamente al interior del núcleo. También se ha observado que L2 interactúa con el DNA viral; esta interacción proteína-DNA no es específica de DNA viral, por lo que L2 puede unirse a DNA celular. La unión es mediada vía carga de un grupo de aa del extremo N-terminal de la proteína L2 conservada en todos los VPH secuenciados. Como L2 es capaz de interactuar con L1 y DNA viral puede jugar un papel en la incorporación de DNA viral dentro del virión por medio de la adición gradual de proteínas capsídicas alrededor de la cromatina viral (Zhou, 1996).

CONTROL DE LA TRANSCRIPCIÓN VIRAL.

Los VPH tienen un tropismo muy marcado hacia las células epiteliales, esto parece deberse en parte a la presencia de un intensificador (enhancer) de la transcripción, que ha mostrado ser activo en células epiteliales y no en otro tipo. Otros experimentos de huella sobre el DNA han mostrado que ciertas secuencias del LCR están protegidas por factores presentes en extractos de células de origen epitelial, diversos autores proponen que estos factores son expresados en células epiteliales y en menor proporción en células de origen no epitelial, pensando así que son más bien ubicuos y no tanto tejido específico. Sin embargo, estas secuencias están también presentes de manera conservada en los promotores de genes que se expresan específicamente en los epitelios (García-Carranca y Gariglio, 1993). El gen E2 de VPH codifica para una proteína que regula los promotores virales que dirigen la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Dowhanick, et al 1995).

Este factor funciona como un trans-activador en VPH cutáneos mientras en VPH genitales actúa como inhibidor de la transcripción (Rangel et al, 1994). Se une al DNA en forma de dímero, específicamente en una secuencia palindrómica: 5'ACCG-NNNN-CGGT-3', esta se encuentra repetida en el LCR de los VPH. Se ha observado que esta proteína activa fuertemente la transcripción de ciertos promotores de VPH así como promotores heterólogos, pero en otros casos también tiene la capacidad de reprimirla (Thierry, 1996). En los promotores en los cuales reprime la transcripción los sitios de unión para E2 son localizados cercanos a elementos esenciales del promotor, como la caja TATA y sitios de unión al factor SP1. En estos casos E2 es probable que interfiera con el ensamblaje del complejo de iniciación de la transcripción (Dowhanick, et al 1995). En cambio, cuando el sitio de unión de E2 está a más de 100 pb del sitio +1 existe activación de la transcripción. En el caso de los tipos virales que colonizan los genitales, los sitios de unión se encuentran justo arriba de la caja TATA aproximadamente a 30 pb del +1 y por tanto tiene un efecto negativo en la expresión de los oncogenes. Por el contrario, en otros tipos que colonizan la piel el efecto de los sitios más cercanos al promotor de E6 es positivo, pues estos se encuentran a más de 120 pb del sitio +1, por lo tanto la proteína E2 juega un papel muy importante en el ciclo viral de los VPH (García Carranca y Gariglio, 1993).

INFECCIÓN VIRAL E INTEGRACIÓN AL GENOMA HUESPED.

La infección por VPH de la mucosa anogenital es ahora conocida como una enfermedad transmitida no sólo sexualmente (Syrjänen, 1996. Schneider, 1996. Cason et al 1996). Estos virus tienen una única estrategia de replicación que depende del programa de diferenciación de la célula blanco, los queratinocitos, tanto de la piel, como de la mucosa anogenital. La infección común por estos virus se lleva a cabo en el estrato basal proliferativo del epitelio cervical donde comienza la replicación viral (actividad propia de los genes tempranos). Conforme la célula tiende a la diferenciación, empiezan a manifestarse la expresión de los genes tardíos del virus, es decir, existe síntesis de proteínas de la cápside conjuntamente con proteínas relacionadas con la diferenciación del epitelio, llevando a la aparición de lesiones líticas (Taja et al 1996). Las proteínas capsídicas L1 y L2 presumiblemente reproducen una estructura que puede interactuar con moléculas de superficie de la célula blanco y facilitar la entrada del DNA viral (Stern, 1996). En cánceres genitales positivos para VPH, el genoma viral es transcripcionalmente activo principalmente los genes E6 y E7, quienes al expresarse tienen la capacidad de inmortalizar queratinocitos. En experimentos recientes se ha demostrado que aunque cambios genéticos han ocurrido en células de carcinoma cervical, la continua expresión de E6 y E7 son necesarias para mantener el fenotipo maligno. Una característica de la progresión de carcinomas relacionados con VPH es la integración del genoma viral al cromosoma de las células blanco en una manera que resulta la pérdida de la expresión del gen E2 (Dowhanick, 1995).

Esta pérdida de la expresión de E2 se debe a que la integración del genoma viral tiene un patrón muy conservado entre los VPH que infectan tractos anogenitales: Ocurre una ruptura del marco de lectura de E2, por consecuencia hay una pérdida de la regulación negativa de la transcripción de E6 y E7 mediada por esta proteína. (Thiery, 1996. Dowhanick, 1995) (fig 3). La integración viral aparenta ser un evento al azar, sin embargo en algunos cánceres estudiados la integración ha ocurrido a un lado de oncogenes como *c-myc*, sugiriendo entonces que el DNA viral y la actividad celular de oncogenes están involucrados en el desarrollo del cáncer Cervico-uterino (Gariglio, 1987). En contraste al estado integrado que es generalmente en cánceres, el DNA viral es usualmente extracromosomal en lesiones premalignas o neoplasia intraepitelial cervical (NIC) (Guido, et al. 1992).

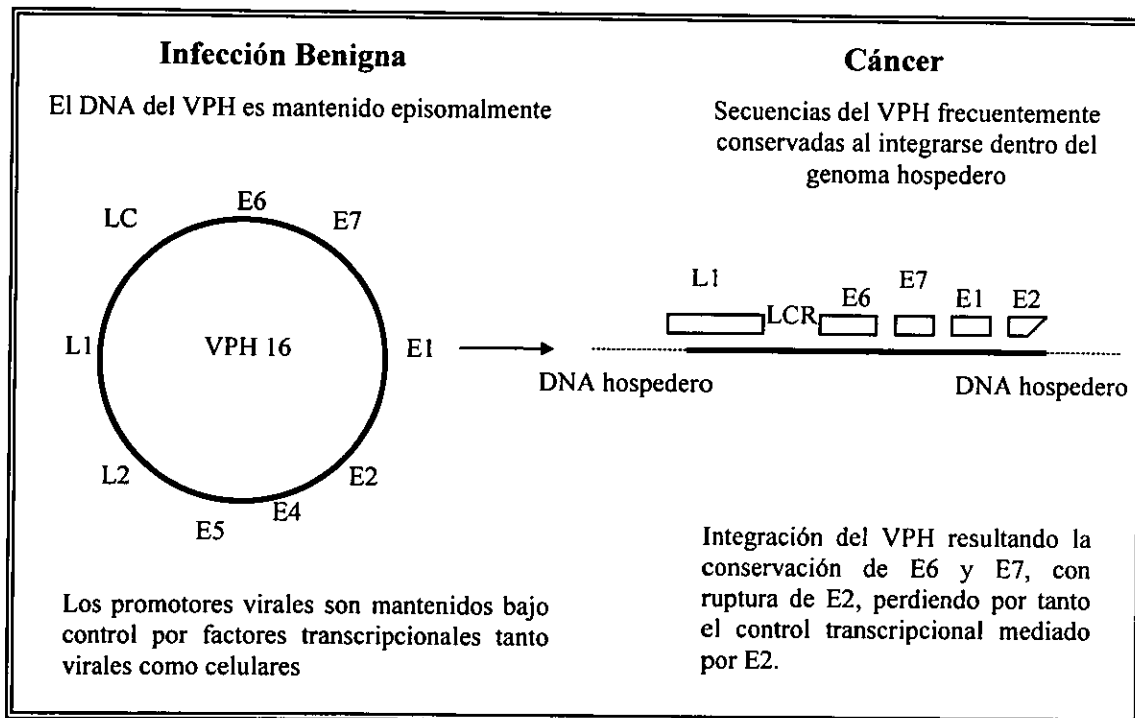


Fig 3.- Genoma del VPH 16 y la posible consecuencia de la integración viral durante el desarrollo del cáncer (Vousden, 1993).

NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL NIC, PRECURSOR DEL CaCu.

La primera evidencia que sugirió la existencia de una lesión precursora del CaCu fue el descubrimiento de anomalías epiteliales no invasivas que frecuentemente existían adyacentes y muy parecidas a las células de carcinoma escamoso del cérvix (Wright, et al. 1996). En la actualidad se conocen a estas lesiones como NIC o Neoplasia Intraepitelial Cervical, se caracterizan porque las células presentan alteraciones nucleares, tales como alargamiento, pleomorfismo e hiper cromasia. Estas han sido separadas en tres grados: NIC I o displasia leve, NIC II o displasia moderada y NIC III o displasia severa comúnmente llamada carcinoma *in situ*, que culmina en un carcinoma invasor en sus diversos estadios. La mayoría de los tumores se cree son desarrollados desde un área de neoplasia intraepitelial dentro de la zona de transformación. Esta se forma de la unión del epitelio exocervical y la línea del epitelio columnar del canal endocervical. (Stern, 1996). La lesión se considera un carcinoma invasor cuando las células transformadas del epitelio cervical han rebasado la membrana basal e invadido el tejido adyacente; el carcinoma *in situ* no ha invadido ningún tejido adyacente ya que su estado es aún delimitado por la membrana basal (Wright, et al. 1996) (fig 4). Sin embargo diversos estudios han comprobado que no precisamente el 100% de las mujeres que presentan NIC progresan a CaCu, por el contrario, muchos casos se revierten a un estado normal (Syrjänen, 1996). Esto puede ser consecuencia de una ruta no relacionada a VPH para neoplasia cervical, que permita un mayor control del crecimiento celular (Burger, 1996). Por esto se piensa que el desarrollo de la enfermedad depende de diversos factores de cada individuo, probablemente su sistema inmune juegue un papel muy importante así como su desarrollo sexual y cultural (Syrjänen, 1996).

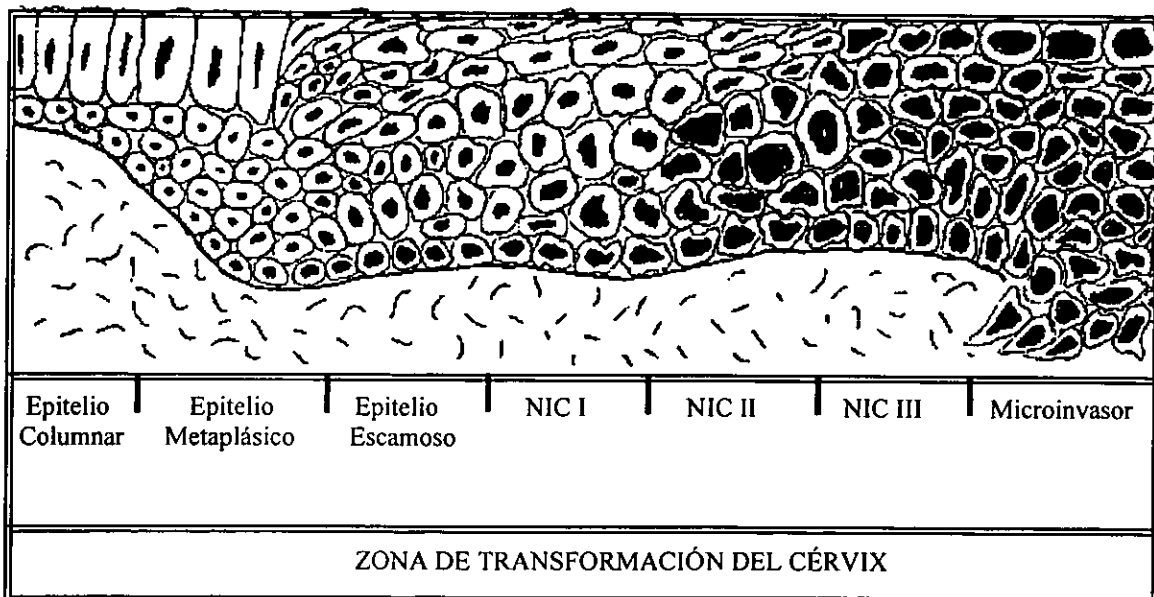


Fig 4.- Queratinocitos formando el epitelio columnar de la zona de transformación del cérvix y diferentes estadios en la progresión del cáncer cervical (Stern, 1996).

ONCOGENES Y ANTI-ONCOGENES.

Las hibridaciones somáticas *in vitro* de células normales con células transformadas han aportado la primera evidencia de que el genoma normal puede restaurar la capacidad de controlar el crecimiento en las células malignas (Klein, 1993). El descubrimiento de los proto-oncogenes (genes normales) y de los oncogenes en la década pasada han permitido explicar el cáncer a un nivel molecular (Gariglio, 1995). La génesis de un tumor se caracteriza por alteraciones en ambos, oncogenes y anti-oncogenes (Zambetti, 1993). Cuando los proto-oncogenes se alteran se transforman en oncogenes activados. Por lo tanto los oncogenes representan formas alteradas de genes normales, entre las alteraciones más frecuentes tenemos, mutaciones, rearreglo genético y amplificación. Los proto-oncogenes más frecuentemente alterados en el cáncer humano son *c-myc* y *ras* (Gariglio, 1995). Existe una segunda clase de genes importantes en el desarrollo del cáncer, estos son llamados anti-oncogenes o genes supresores de tumor. Junto con *p53*, *RB* ha sido uno de los más importantes anti-oncogenes conocidos, el gen *RB* es altamente conservado entre los vertebrados, entre distintas especies existe una gran homología, principalmente en la región del promotor la cual contiene sitios de unión para factores de transcripción como ATF, Sp1, y E2F. La proteína *pRB* es localizada en la eucromatina de la interfase nuclear (Wiman, 1993). Puede actuar como un factor de diferenciación celular, o bien como un factor transcripcional (Hamel, et al 1993). La forma no fosforilada de *pRB* se cree actúa como un punto que controla la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Klein, 1993). *pRB* es hiperfosforilada en la fase tardía de G1 del ciclo celular, y se mantiene así en las fases S, G2 y M. Las células en G0/G1 expresan *pRB* en una forma no fosforilada, de esta manera *pRB* puede unirse a diversas proteínas celulares. Una de ellas es el factor transcripcional E2F, que es requerido para la expresión de genes celulares que participan en el control del crecimiento y síntesis de DNA. Genes que contienen sitios de unión para E2F en su promotor incluyen *c-myc*, *n-myc*, timidina cinasa, *dhrf*, DNA polimerasa α , *cdc2* y *RB* (Wiman, 1993). Las interacciones con E2F solo representan una parte de las actividades de *RB* en la regulación del crecimiento celular, se ha observado que forma complejos con otros factores transcripcionales, con la tirosina-cinasa citoplasmática *c-Abl* y miembros de la familia de la ciclinas D (Vousden, 1994). En la fase G0 y G1 del ciclo celular E2F se une a la forma no fosforilada de *pRB*, por lo tanto se piensa que el complejo E2F-RB funciona como un represor de la transcripción de los genes que participan en el control del crecimiento y síntesis de DNA, se cree que esto ocurre porque *pRB* bloquea la interacción entre E2F y otros componentes del aparato transcripcional. Pero el complejo E2F-RB puede ser disociado por fosforilación de *pRB* mediante cinasas dependientes de ciclinas, lo que ocurre normalmente cuando el ciclo celular se aproxima a la fase S, o bien por oncoproteínas virales que se unen a *pRB* en células infectadas por virus. Esto trae como consecuencia la liberación de E2F y entonces la activación transcripcional de los genes que posee sitios de unión para ella y que participan en la división celular, llevando así a un estado de crecimiento incontrolado (Wiman, 1993)(fig 6). *p53* es otro anti-oncogen que participa en el control del ciclo celular, tiene una longitud aproximada de 20 kb, codifica para una fosfoproteína nuclear de 53 kDa, la cual contiene 393 aa y está muy conservado a través de la evolución, posee 5 dominios estos son considerados como

esenciales para la función de la proteína silvestre *p53*, los puntos de mutaciones más frecuentes en cáncer son predominantemente localizados en estos 5 dominios, estos incluyen 2 dominios de unión al DNA, 2 dominios de unión al ag T de SV40, tres señales de localización nuclear (NLS) en el extremo C-terminal de la proteína, con el predominante NLS en posición adyacente a serina, la cual es fosforilada por cdc-2/p34 cinasa. Se piensa que la fosforilación de esta serina podría influenciar en la carga de la proteína alterando su localización subcelular y actividad biológica en el ciclo celular. (Baker, 1996. Zambetti, 1993). *p53* funciona como un regulador negativo del crecimiento celular, juega un importante papel en la estabilidad genómica y reparación del DNA, induce apoptosis y es capaz de detener el ciclo celular en la fase G1, presumiblemente en este momento la célula repara el daño a su DNA y mantiene la integridad genómica antes de progresar a la fase S y experimentar síntesis de DNA (Park, 1995) (fig 5). *p53* funciona como un transactivador y represor transcripcional dependiendo si el gen blanco posee un sitio de unión específico a *p53* (Zambetti, 1993). Activará la transcripción de promotores que contienen un sitio de unión para *p53*, mientras promotores de genes tales como *c-fos* y *c-jun*, carentes de elementos de respuesta a *p53* son transcripcionalmente reprimidos por *p53*. Esta supresión transcripcional puede deberse a la habilidad de *p53* a unirse y secuestrar factores transcripcionales que son requeridos para la expresión de estos genes (Razvi, 1995). La proteína *p53* mutada puede actuar como un oncogén, regulando negativamente *p53* silvestre de una manera *trans*-dominante, así como funcionar como un activador transcripcional (Zambetti, 1993). *p53* es el gen más frecuentemente alterado en cáncer humano, más del 90% de las mutaciones cambian la identidad de un sólo aa, estas pueden alterar su conformación, incrementar la estabilidad de la proteína, alterar indirectamente la secuencia específica de unión al DNA así como la actividad de factor de transcripción. Por lo tanto estas mutaciones pueden causar ya sea una pérdida de la función del gen supresor de tumor o bien una ganancia de función oncogénica por alteración del repertorio de genes controlados por *p53* (Harris, 1993).

CONTRIBUCIÓN DE E6 Y E7 EN LA CARCINOGENÉISIS.

Diferentes estudios han demostrado que muchas de las actividades oncogénicas de E6 y E7 son dependientes de su capacidad de interactuar con proteínas celulares de quienes su papel normal es la regulación negativa de la proliferación celular. Los mecanismos moleculares por los cuales E6 funciona como oncoproteína es a través de la inhibición de las funciones de *p53*, forma un complejo estable E6-*p53*, lo cual resulta en una rápida degradación proteolítica de la proteína *p53* a través de una vía dependiente de ubiquitina (Vousden, 1993). La degradación de *p53* mediada por E6 requiere de una tercera proteína llamada E6-AP, una proteína de 100 Kd la cual, en combinación con E6 funciona como una E3 ligasa de ubiquitina, transfiriendo ubiquitina a *p53* (Crook, 1996) (fig 5). E6 tiene la capacidad de alterar las funciones de activación y represión transcripcional de *p53*. A este respecto E6 muestra alguna similitud a ciertas formas mutantes de *p53*, las cuales no funcionan como reguladores transcripcionales y pueden también inactivar la proteína *p53* silvestre (Vousden, 1993). Otra función de *p53* la cual puede ser inhibida solo siguiendo la degradación directa por E6 es la inducción de la

apoptosis o muerte celular programada. Aunque la oligomerización es importante para algunas funciones de *p53*, la forma monomérica de la proteína retiene la habilidad a inducir apoptosis. Interesantemente, se ha demostrado que E6 tiene la capacidad de blanquear ambas formas de *p53* para degradarlas, así facilitando una inhibición de la apoptosis inducida por ambas formas de *p53* (Crook, 1996). La pérdida de la actividad de *p53* contribuye al desarrollo de muchos cánceres humanos, posiblemente por permitir la acumulación de daño genético e inestabilidad. Las interacciones entre E6 y *p53*, por lo tanto, representan potencialmente un importante paso en la progresión de muchas alteraciones cervicales (Vousden, 1993).

La habilidad de E7 para formar complejos con la proteína celular *RB* contribuye al desarrollo de cánceres asociados a VPH, diversos estudios sugieren que la expresión de E7 puede provocar una pérdida de la función de *pRB*, ya que tiene la capacidad de unirse a su forma no fosforilada que es la forma participante en la regulación del crecimiento y por esto puede romper o alterar los complejos celulares que se forman entre la familia de proteínas de *pRB* y factores de transcripción como E2F y DP1 (fig 6). La expresión de E7 puede provocar una actividad transcripcional liberando a E2F en estados del ciclo celular donde es normalmente localizada inactiva por formar complejos con otras proteínas, hay como consecuencia proliferación anormal por la expresión incontrolada de genes que conducen hacia la fase S del ciclo celular, por ejemplo *cdc2*, ciclina A, ciclina D, DNA polimerasa A, *c-myc* (Vousden, 1993). La importancia de la interacción E7-*pRB* con actividad oncogénica es fuertemente soportada por la reducida afinidad de la proteína E7 de los VPH de bajo riesgo hacia *RB*. La sustitución de un simple aa dentro de la región de unión a la proteína *RB* de estos VPH incrementa dramáticamente la afinidad de E7 por *RB* y puede entonces provocar la actividad transformante (Vousden, 1994).

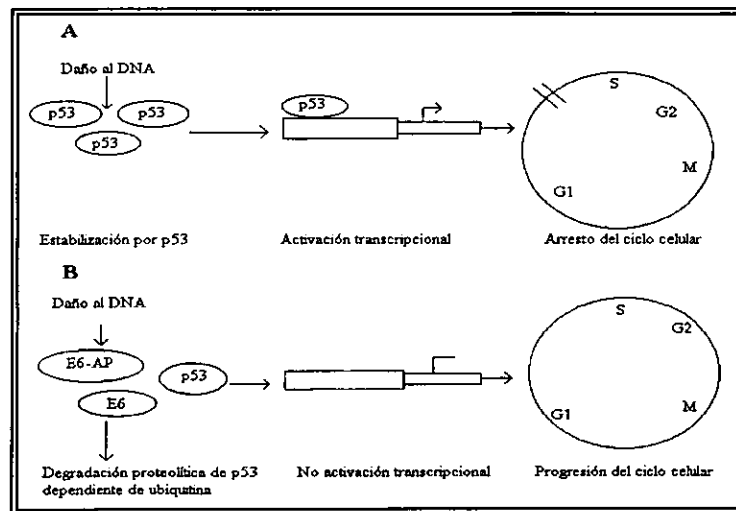


Fig. 5 (A) Inducción de la actividad de *p53* debido a daño en el DNA en células normales resultando la activación transcripcional de genes celulares y paro del ciclo. (B) Degradación proteolítica de *p53* por unión a E6, impidiendo así el bloqueo de la progresión del ciclo celular (Vousden, 1994).

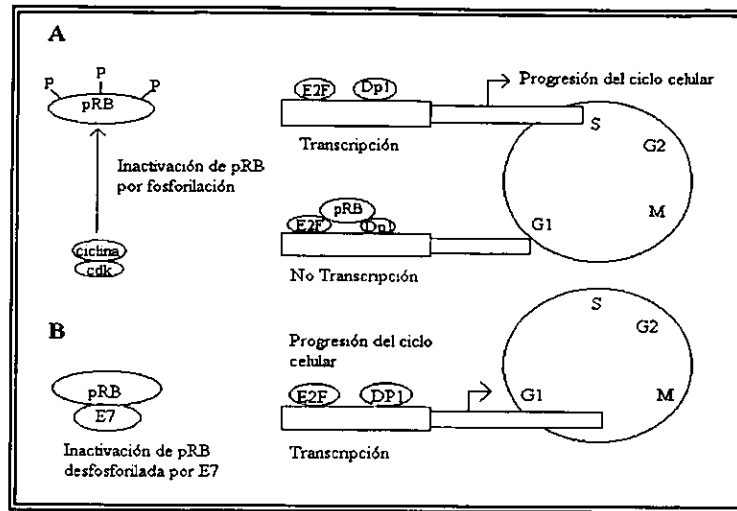


Fig 6.- Participación de pRB en el control del factor de transcripción E2F, la cual consiste de combinaciones heterodiméricas de DP1 y varias proteínas E2F. (A) Regulación durante la fase G1 de una célula normal y (B) la consecuente inactivación de esta función en las células que expresan E7 (Vousden, 1994).

ASPECTOS INMUNOLÓGICOS.

INMUNIDAD HUMORAL. La inmunidad humoral o mediada por anticuerpos se presenta en pacientes con infecciones por VPH, los cuales han demostrado una asociación entre la presencia de anticuerpos y carcinoma cervical invasor (Jochmus, 1996. Tzyy, 1994). Se han detectado Ab contra proteínas virales tales como E7, E2, E4, E6, pero no existe un patrón de Ab característico, parece participar el tiempo de evolución, así como el o los tratamientos recibidos (Tzyy, 1994). El aumento de Ab en pacientes con cáncer cervical puede ser explicado por el largo periodo de exposición del sistema inmune a estas proteínas (Jochmus, 1996). Los Ab contra los VPH pueden jugar un papel funcional en la prevención de infección por virus, neutralizando y limpiando las células infectadas vía citotoxicidad celular mediada por Ab. Además, la presencia de Ab en el suero de pacientes contra proteínas del VPH demuestran que ha habido infección, por lo tanto son de utilidad en el diagnóstico y probablemente se pueda pronosticar su evolución (Stern, 1996). En general los estudios de inmunidad humoral contra infecciones de VPH no dan evidencias para un papel importante de Ab en la defensa inmune contra lesiones inducidas por VPH (Jochmus, 1996).

INMUNIDAD CELULAR. Las infecciones por VPH pueden persistir por décadas, esto puede ocurrir debido que la presentación de los Ag por queratinocitos infectados es demasiado baja como para inducir respuesta de linfocitos T o bien ser deficientes en moléculas co-estimuladoras. Otra alternativa, es que las células presentadoras de los Ag (CPA) no sean atraídas al sitio de infección (Kast, et al 1996). El número de células de Langerhans se observan sin alteración en las lesiones de bajo grado (NIC I) y verrugas genitales. Sin embargo el epitelio de lesiones de alto grado (NIC II/III) tiene baja densidad de este tipo celular, las pocas que están presentes muestran una alterada morfología y distribución, lo que también contribuye a la reducida respuesta de estas lesiones para activar mecanismos inmunes mediados por linfocitos T (Jochmus, 1996. Stern, 1996). El reconocimiento inmune de Ag virales por los linfocitos T se hace en la restricción genética del complejo principal de histocompatibilidad (MHC). Los HLA de clase I son expresados en todas las células nucleadas aunque en diferentes niveles; ellos consisten de una cadena con tres dominios, $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ codificados en el loci HLA-A,B y C, la cual se asocia con $\beta 2$ -microglobulina. Las moléculas HLA de clase I presentan péptidos procesados a los linfocitos T CD8+ (Stern, 1996). El papel de la respuesta inmune mediada por células en el control de lesiones asociadas a VPH es soportada por un extensivo infiltrado de linfocitos T CD8+ (Frazer et al, 1996). Las moléculas de HLA clase II comprenden dos cadenas, α y β , ambos codificados en el loci HLA- DR, DQ o DP y están presentes en la superficie de células del sistema inmune y en ciertos epitelios especializados. Las HLA clase II presentan antígenos peptídicos a los linfocitos T CD4+ que tienen la función de proveer ayuda a los linfocitos T citotóxicos y a la producción de anticuerpos por las células plasmáticas, mediante la producción de citocinas (Stern, 1996). La generación de una respuesta inmune efectiva depende de la secreción de citocinas específicas, las cuales alertan a las células del sistema inmune que se activan entonces en el sitio de la infección. Las células normales cervicales constitutivamente secretan citocinas. Por el contrario las células inmortalizadas por VPH muestran una disminuida expresión de ellas (Tzyy, 1994). El inicio de la inmunidad mediada por células requiere la presencia específica del receptor de células T (TCR) reconociendo péptidos virales inmunogénicos en las moléculas de HLA de la superficie de CPA. La interacción MHC-TCR es fuertemente estabilizada por moléculas CD4 o CD8 expresadas por linfocitos T. La activación de linfocitos T requiere de la interacción de moléculas accesorias entre los linfocitos T y las CPA. Por ejemplo el complejo pentamérico CD3, la molécula de adhesión intercelular tipo I (ICAM-1), antígeno de función linfocítica (LFA-3), y CD80. La presentación de los Ag en ausencia de tales co-estimuladores puede inducir tolerancia al Ag estimulante (Stern, 1996). En adición a los linfocitos T existen otras células que pueden participar en la respuesta inmune incluyendo las células asesinas (NK) presentes en la mayoría de lesiones asociadas a VPH y NIC. Sin embargo, las células de cáncer cervical positivas para VPH y los epitelios cervicales humanos inmortalizados por VPH, los cuales poseen propiedades similares a displasia cervical, son resistentes a células NK. Algunos pacientes con cáncer y lesiones precursoras son reportados en tener poca actividad celular NK. Otro grupo celular es también potencialmente importante mediador de la inmunidad celular anti-tumor, los macrófagos, siendo su principal función la fagocitosis de células infectadas (Tzyy, 1994).

Los mecanismos funcionales correctos del sistema inmune son alterados en cáncer cervical. Se ha observado la baja expresión de moléculas de HLA clase I sobre la superficie de células infectadas en estos pacientes (Connor, 1990). Sin embargo en pacientes con lesiones de bajo grado esta baja expresión no es muy frecuente (Duggan, 1996). En la mayoría de los casos la baja expresión de HLA clase I, coincide con la expresión deficiente de una proteína asociada al transporte de péptidos (TAPs) lo cual podría explicar esta alteración (Cromme, 1994). La causa de la expresión deficiente de TAPs es aún desconocida, se cree que los mismos VPH juegan un papel inmunosupresivo, debido a que pueden interferir con la presentación de los Ag. Se ha sugerido que E5 interfiere con la función de TAPs (Kast, 1996. Duggan, 1996). Los cambios en la expresión de HLA clase I observados en neoplasias cervicales pueden resultar también de la alteración en algunos estados específicos, desde la iniciación de la transcripción del gen, el ensamblaje de la cadena pesada α con β 2-microglobulina y el péptido en el lumen del retículo endoplásmico, hasta la estabilidad de la expresión en la superficie celular, o bien por la influencia de proteínas oncogénicas celulares como *c-myc* (Duggan, 1996). En estudios recientes se han detectado transcritos del HLA clase I pero no la proteína, lo que sugiere que la pérdida de la expresión de HLA clase I es un evento post-transcripcional (Stern, 1996, Duggan, 1996, Cromme, 1993).

En cérvix sano, las moléculas de HLA clase II son expresadas por el epitelio columnar y no por el epitelio escamoso. Sin embargo la mayoría de los epitelios escamosos transformados muestran una sobre-expresión de HLA clase II (Cromme, 1993. Glew, 1992. Stern, 1996). Este incremento en la expresión de HLA clase II correlaciona con la severidad de la displasia; en lesiones cervicales no aparenta ser generada por respuesta a citocinas, ya que no hay correlación con el infiltrado leucocitario (Duggan, 1996). El significado funcional de estos cambios es aún desconocido. Las células tumorales co-expresan diversas moléculas accesorias que son necesarias para la presentación del Ag, pero unas tan importantes como el ligando CD28 son perdidas y entonces permiten la inducción de tolerancia facilitando el crecimiento de tumor (Stern, 1996). Sin embargo diversos estudios indican que las alteraciones en la expresión de las moléculas HLA clase I y II son independientes de la presencia de DNA de VPH (Glew, 1992. Cromme, 1993. Kast, 1996. Stern, 1996. Duggan, 1996).

OBJETIVO GENERAL:

Evidenciar la presencia, por técnicas de biología molecular, de los Virus del Papiloma Humano de alto riesgo (VPH-16 y VPH-18) en lesiones pre-cancerosas y cancerosas de cérvix.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Identificar, por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la presencia de DNA del VPH en lesiones pre-cancerosas y cancerosas de cérvix.
- b) Tipificación del VPH por medio de PCR, usando oligonucleótidos específicos para VPH-16 y VPH-18.
- c) Analizar el tipo y la frecuencia de VPH en lesiones pre-cancerosas y cancerosas del cérvix en mujeres mexicanas.

JUSTIFICACIÓN

En México el cáncer cervical es uno de los principales problemas de salud pública, cada año se registran más de 4,000 muertes por esta enfermedad (Taja et al, 1996, Lazcano et al, 1996). A pesar de la existencia del Programa de Detección Oportuna de Cáncer utilizando el Papanicolaou, la Colposcopia y la Histología como métodos de diagnóstico desde hace 20 años, no ha modificado la mortalidad por cáncer cervical en México (Lazcano et al. 1996). En estudios recientes se ha comprobado que la prueba común de detección del cáncer cervical (papanicolaou) es en el 64% de sus ejemplares deficiente para un diagnóstico confiable, ya que carece de células endocervicales y metaplasia epidermoide, aunado a esto, se han detectado centros de diagnóstico con un índice de resultados falsos negativos hasta de 54%. Por los datos anteriores podemos decir que el Programa de Detección Oportuna de Cáncer en México previene menos del 13% de los casos potencialmente previsible. Debido a esto y a la alta frecuencia del VPH en esta patología, es necesario desarrollar alternativas de diagnóstico que identifiquen mujeres de alto riesgo con eficiencia y precisión. Una alternativa sería mediante el diagnóstico molecular de infección por VPH Así mujeres que sean portadoras del virus tendrán que ser vigiladas más frecuentemente. De esta manera se tratará de ayudar a reducir la incidencia de la enfermedad por medio del diagnóstico oportuno de la infección del VPH en cérvix.

ANTECEDENTES.

La etiología viral de las verrugas humanas fue establecida por Ciuffo en 1907, él observó que la transmisión entre humanos podría ocurrir por inoculación de extractos celulares obtenido de ellas (Botchan 1984, Fields 1990). El primer experimento que intentó relacionar esta infección con el desarrollo del cáncer y estudiar las interacciones con otros factores carcinogénicos fue hecho por Rous y colaboradores en 1930. Basado en observaciones iniciales por Shop (1933), Rous demostró el potencial carcinogénico de la infección por papilomavirus del conejo de cola blanca (CRPV) en conejos domésticos. Esta actividad carcinogénica de CRPV fue fuertemente demostrada por Ito y Evans en 1961, quienes indujeron carcinomas en conejos domésticos con DNA purificado de CRPV (zur Hausen 1994). La primera visualización de partículas del papilomavirus en verrugas humanas por microscopía electrónica fue reportada en 1949, pero la estructura del genoma del papilomavirus fue propuesta por Crawford hasta 1963. Sin embargo la baja eficiencia de los sistemas de cultivo de tejido, y la aparente naturaleza benigna de verrugas humanas provocaron pocos experimentos adicionales en los años subsecuentes obteniendo entonces una limitada información sobre las proteínas virales y relaciones inmunológicas (zur Hausen 1994).

En las décadas de los 50's y los 60's dos diferentes líneas de estudio contribuyeron al desarrollo de la investigación de papilomavirus: En 1959 Olson y col. reportaron la inducción de tumor en la vejiga urinaria en ganado vacuno por un papilomavirus bovino (BPV). Los mismos virus fueron tumorigénicos en hámsters y capaces de transformar células de murinos en cultivos celulares. El segundo estudio tiene sus raíces en 1922, cuando Lewandowsky y Gissmann reportan un rara verrucosis hereditaria en humanos con desarrollo de carcinoma de piel. Ellos llaman a este síndrome Epidermodisplasia Verruciforme, pero no fueron capaces de demostrar su origen infeccioso. Posteriormente esto fue demostrado por el mismo Gissmann en 1957, después de inducir papilomas con auto inoculación de extractos celulares (zur Hausen 1994).

En los años 70s cuando las técnicas de clonación molecular de DNA viral estaban disponibles una gran pluralidad de papilomavirus humanos y animales fueron reconocidos. La caracterización del DNA viral clonado de lesiones individuales y los estudios de hibridación de DNA han permitido la identificación de 60 diferentes VPH así como el reconocimiento de la especificidad de lesiones producidas por infección con diferentes tipos (Fields, 1990). Existe una clara evidencia epidemiológica, clínica y molecular que eslabona los papilomavirus a difundir serias enfermedades humanas particularmente carcinomas de mucosas genitales y orales (Botchan, 1986).

En los años 80s la identificación de nuevos tipos de VPH (6 y 11) de verrugas genitales y de biopsias de cáncer cervical (16 y 18) provocó una rápida expansión de trabajos experimentales y estudios epidemiológicos (zur Hausen, 1994). La infección por VPH de la mucosa genital es ahora reconocida entre la mayoría de enfermedades transmitidas sexualmente y es un factor definitivo en el desarrollo del cáncer cervical (Fields 1990).

Desde entonces el VPH emerge como el más común carcinomavirus en humanos (zur Hausen, 1994).

MATERIAL Y MÉTODO.

MUESTRAS: Se colectaron 60 biopsias de pacientes que acudieron a las consultas externas en la clínica de displasias y ginecología oncológica en los hospitales: "Hospital de la Mujer" y Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE respectivamente. Se clasificaron de acuerdo a su diagnóstico clínico en los diferentes grados de lesiones pre-malignas y malignas del cérvix. Se congelaron en nitrógeno líquido inmediatamente después de tomarlas. Posteriormente se hizo la extracción de DNA en el laboratorio.

OBTENCIÓN DE DNA. Para la extracción de DNA se empleó el método descrito por Maniatis (1989) y Gramza (1995). Cada una de las biopsias congeladas se depositaron en un sobre de aluminio previamente esterilizado, se sumergieron en nitrógeno líquido, rápidamente se colocaron en una superficie fría, se procedió entonces a pulverizar el tejido por medio de unos golpes (Gramza et al, 1995). El tejido pulverizado se mezcló con 700 μ l de buffer de lisis (100mM NaCl, 10mM de tris HCL pH 8, 25mM de EDTA pH 8, 0.5% de dodecil sulfato de sodio). Se agregaron 10 μ l de proteinasa K a una concentración de 10 μ g/ μ l y se incubaron por toda la noche en baño maría a 53° C. La siguiente fase es limpiar el DNA con un solvente orgánico, para ello se agregó un volumen igual de fenol (saturado con tris-HCL 0.01 M; EDTA 0.5 mM, bidestilado, pH 8), se mezcló perfectamente y centrifugó a 12000 rpm durante 5 min, se separó la fase acuosa (fase superior, tener cuidado de no tomar la interfase ya que contiene desechos de proteínas). Se agregó a esta un volumen igual de fenol-cloroformo (1:2), se mezcló perfectamente y centrifugó a 12000 rpm durante 5 min, se separó la fase acuosa, se agregó a esta un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló perfectamente y centrifugó a 12000 rpm durante 5 min, se separó la fase acuosa, se agregó a esta un volumen igual de cloroformo, se mezcló perfectamente y centrifugó a 12000 rpm durante 5 min, se separó la fase acuosa y se precipitó con 1/10 del volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol absoluto, se dejó incubar a -20°C por toda la noche. 12 horas después se centrifugó a 12000 rpm 30 min a 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla 2 veces con 700 μ l de etanol al 80%, se centrifugó a 12000 rpm cada lavado, se decantó el sobrenadante y se secó la pastilla hasta que estuviese totalmente transparente. La pastilla fue resuspendida en 100 μ l de agua inyectable, se tomaron 5 μ l y se diluyeron en 495 μ l de agua, se cuantificaron entonces a 260 nm en un espectrofotómetro Gene Quant Marca Pharmacia, para ajustar a una concentración de 100ng/ μ l.

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR). La identificación de infección por VPH se realizó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa PCR (Iwasawa et al 1996, Nakagawa et al 1996, Ulrike et al 1996). Así, el DNA obtenido de las 60 biopsias se utilizó para llevar a cabo diferentes reacciones: La primera sirvió para analizar la calidad del DNA, para ello se utilizaron oligonucleótidos que flanquean el gen constitutivo de la β -globina, los cuales amplifican un fragmento de 268 pb, su secuencia es: β g 1 5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3' y β g 2 3'-GGAAAATAGACCAATA GGCAG-5', el cual nos proporcionará el dato de que el DNA es apto para diagnóstico molecular (Fujinaga, 1991). Bajo las siguientes condiciones por muestra:

MEZCLA DE REACCIÓN		CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN			
REACTIVO	VOLUMEN	ETAPA	T°	TIEMPO	CICLOS
Buffer de PCR	2.5 μ l a 10X	DesnaturalizaciónI.	96° C	4 min	1
MgCl	1 μ l a 50 mM				
dNTP's	0.5 μ l a 10 mM	Desnaturalización	96° C	15 seg	35
Oligonucleótido β g 1	0.25 μ l a 800ng				
Oligonucleótido β g 2	0.25 μ l a 800ng	Alineación	59° C	30 seg	35
Taq polimerasa	0.2 μ l a 5u/ μ l				
DNA de muestra	5 μ l a 100 ng/ μ l	Elongación	72° C	1 min	35
Agua	15.3 μ l				
Volumen Final	25 μ l	Elongación final	72° C	10 min	1

IDENTIFICACIÓN DE INFECCIÓN POR VPH. La segunda PCR fue hecha con el primer juego de oligonucleótidos utilizados para diagnosticar la presencia de DNA del VPH en el genoma celular, los cuales flanquean una secuencia muy conservada de la región L1 del genoma de los VPHs 6, 11, 16, 18, 31, 33, de un peso molecular entre 244 y 256 pb dependiendo el tipo de VPH. Su secuencia es: L1C1 5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTTT-3' L1C2 3'-GTTATGTCTCATAAATCCCAT-5' (Yoshikawa, 1991). Bajo las siguientes condiciones por muestra:

MEZCLA DE REACCIÓN		CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN			
REACTIVO	VOLUMEN	ETAPA	T°	TIEMPO	CICLOS
Buffer de PCR	2.5 μ l a 10X	DesnaturalizaciónI.	94° C	5 min	1
MgCl	1 μ l a 50mM				
dNTP's	0.5 μ l a 10mM	Desnaturalización	90° C	1 min	35
Oligonucleótido L1C1	0.35 μ l a 600ng				
Oligonucleótido L1C2	0.35 μ l a 600ng	Alineación	46° C	30 seg	35
Taq polimerasa	0.2 μ l a 5u/ μ l				
DNA de muestra	5 μ l a 100ng/ μ l	Elongación	72° C	1.30 min	35
Agua	15.1 μ l				
Volumen Final	25 μ l	Elongación final	72° C	10 min	1

La tercera PCR y segunda para diagnosticar fue realizada con otro juego de oligonucleótidos, los cuales flanquean otra región distinta a los anteriores, pero también dentro de la región conservada del gen L1 de los VPHs 6,11,16,18,36, de un peso molecular entre 448-451 pb dependiendo el tipo VPH. Su secuencia es: MY 11 5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3' MY 09 3'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-5' (Manos, 1990). Bajo las siguientes condiciones por muestra:

MEZCLA DE REACCIÓN		CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN			
REACTIVO	VOLUMEN	ETAPA	T°	TIEMPO	CICLOS
Buffer de PCR	2.5µl a 10X	Desnaturalización I.	96° C	4 min	1
MgCl	0.8µl a 50 mM				
dNTP's	0.5µl a 10 mM	Desnaturalización	96° C	15 seg	30
Oligonucleótido MY11	0.12µl a 900ng				
Oligonucleótido MY09	0.12µl a 900ng	Alineación	55° C	30 seg	30
Taq polimerasa	0.2µl a 5u/µl				
DNA de muestra	5µl a 100ng/µl	Elongación	72° C	1 min	30
Agua	15.76µ				
Volumen Final	25µ	Elongación final	72° C	10 min	1

TIPIFICACIÓN DE VPHs. Se tipificaron sólo aquellas muestras que resultaron positivas a cualquiera de las dos reacciones de diagnóstico anteriores. Se realizó con oligonucleótidos específicos para los VPH de alto riesgo y más frecuentes reportados: VPH 16 y VPH 18 (Shimada, et al 1990).

TIPIFICACIÓN DE INFECCIÓN POR VPH 16. Se hizo mediante PCR, utilizando un juego de oligonucleótidos específicos para una región del gen E6 del VPH 16. La región que flanquean va de la base 26-165 y tiene un peso molecular de 140 pb, su secuencia es: p16-1R 5'-AAGGGCGTAACCGAAATCGGT-3' con una localización en E6 de la base 26 a la 46; p16-2R 5'-GTTTGCAGCTCTGTGCATA-3' con una localización en E6 de la base 147 a la 165. Bajo las siguientes condiciones por muestra:

MEZCLA DE REACCIÓN		CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN			
REACTIVO	VOLUMEN	ETAPA	T°	TIEMPO	CICLOS
Buffer de PCR	2.5µl a 10x				
MgCl	1.5µl a 50 mM	Desnaturalización I.	94° C	10 min	1
DMSO	1µl				
dNTP's	0.5µl a 10 mM	Desnaturalización	94° C	1 min	30
Oligonucleótido p16 1R	1.5µl a 10 µM				
Oligonucleótido p16 2R	1.5µl a 10 µM	Alineación	59° C	1.30 min	30
Taq polimerasa	0.2µl a 5u/µl				
DNA de muestra	5µl a 100ng/µl	Elongación	72° C	2 min	30
Agua	11.3µl				
Volumen Final	25µl	Elongación final	72° C	10 min	1

TIPIFICACIÓN DE INFECCIÓN POR VPH 18. Se hizo mediante PCR, utilizando un juego de oligonucleótidos específicos para una región del gen E6 del VPH 18. La región que flanquean va de la base 26-172 y tiene un peso molecular de 146 pb, su secuencia es: p16-1R 5'-AAGGGCGTAACCGAAATCGGT-3' con una localización en E6 de la base 26 a la 46; p18-2R 5'-GTGTTTCAGTTCGGTGCACA-3' con una localización en E6 de la base 154 a la 172. Bajo las siguientes condiciones por muestra.

MEZCLA DE REACCIÓN		CONDICIONES DE AMPLIFICACIÓN			
REACTIVO	VOLUMEN	ETAPA	T°	TIEMPO	CICLOS
Buffer de PCR	2.5µl a 10X				
MgCl	1.5µl a 50mM	Desnaturalización I.	94° C	10 min	1
DMSO	1µl				
dNTP's	0.5µl a 10mM	Desnaturalización	94° C	1 min	25
Oligonucleótido p16 1R	1.3µl a 10µM				
Oligonucleótido p18 2R	1.3µl a 10µM	Alineación	62° C	2 min	25
Taq polimerasa	0.2µl a 5u/µl				
DNA de muestra	5µl a 100ng/µl	Elongación	72° C	2 min	25
Agua	16.7µl				
Volumen Final	25µl	Elongación final	72° C	10 min	1

PREPARACIÓN DE LAS REACCIONES. Todas las reacciones en cadena de la polimerasa se practicaron con base a un mismo modelo, es decir, en cada reacción se corrieron las muestras junto con dos controles, un positivo y un negativo. El control positivo estuvo formado por DNA de líneas celulares tales como Hela, Siha, y C-33. El control negativo fue el agua. En las reacciones para β -globina, se usó el DNA de la línea celular Hela como control positivo y el agua como control negativo. Para las reacciones de diagnóstico (PCR con oligonucleótidos L1 y MY) se usó también la línea celular Hela como control positivo ya que contiene integrado en su genoma DNA del VPH tipo 18 y ambos juegos de oligonucleótidos lo flanquean, como control negativo se usó agua. Para la tipificación de las muestras positivas de los anteriores experimentos se corrieron junto con ellas tres controles, uno positivo para cada tipo de VPH, es decir para tipificar VPH 16 se tomo como control positivo la línea celular Siha ya que posee integrado en su genoma el DNA del VPH tipo 16, como controles negativos se corrieron tanto Hela (con VPH 18) y la línea celular C-33 que es derivada de un CaCu pero negativa para la infección del VPH. Del mismo modo pero ahora como control positivo la línea celular Hela se corrió la tipificación del VPH 18, como controles negativos quedaron entonces las líneas celulares Siha (con VPH 16) y C-33 (sin VPH). Cada una de las reacciones se cubrieron con 15 µl aceite mineral (Sigma) y se llevaron a cabo en un DNA Thermal cycler 480 (Perkin Elmer).

PREPARACIÓN DE LOS RESULTADOS. La migración de las moléculas a través de un soporte inerte cuando se les aplica un campo eléctrico se conoce como electroforesis. Este fenómeno ha sido aprovechado para la separación de moléculas en base a su masa y carga eléctrica. Así 5 μ l de los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 1.5%, conteniendo 3 μ l de bromuro de ethidio a una concentración de 10 μ g/ml por cada 100 ml de gel. El gel fue sumergido en TAE 1X (tris base 40mM, ácido acético 40 mM, EDTA 2mM pH 8) y sometido a un voltaje de 75 Volts por 40 minutos, las muestras se cargaron junto con 1 μ l de colorante indicador de corrida (azul de bromofenol). La presencia de amplificación se visualizó bajo luz ultravioleta en un transiluminador Stratagene mod. EE II Still Video.

RESULTADOS

De las 60 biopsias que se obtuvieron 7 se diagnosticaron clínicamente como neoplasia intraepitelial cervical I (NIC I), 10 como NIC II, 20 como NIC III o CaCu *in situ* y 21 eran ya consideradas como CaCu invasor, finalmente 2 como condiloma acuminados o lesiones de bajo grado (gráfica 1).

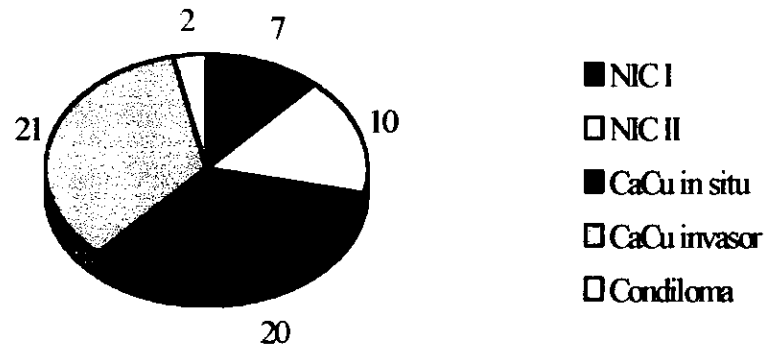
Después de la extracción del DNA de cada biopsia se realizó una PCR amplificando el gen constitutivo de la β -globina con la finalidad de verificar su calidad y poder ser usado entonces en el diagnóstico. Todos los DNAs mostraron una calidad optima amplificando una región de este gen (fig 7).

Usando los oligonucleótidos L1C1/C2 para el diagnóstico molecular se evidenció la presencia del DNA del VPH en todos los estadios, así en 1 NIC I (14.2%), en 2 NIC II (20%), en 5 CaCu *in situ* (25%), en 13 CaCu invasor (62%) y finalmente en 1 condiloma (50%) (tabla y gráfica 2). Con los oligonucleótidos MY09/11 se evidenció la presencia del DNA del VPH solo en estadios avanzados de la enfermedad, es decir, en 5 CaCu *in situ* (25%) y en 10 CaCu invasor (47.6%) y en uno de los dos condilomas (50%) (tabla 2 y gráfica 3). Por tanto se obtuvo un total de 25 biopsias positivas que corresponden al 41.6% de las muestras (gráfica 4, fig 8 y 9). Al tipificar con los oligonucleótidos específicos se encontró la presencia de DNA del VPH tipo 16 en todas las lesiones pre-malignas del cérvix es decir de NIC I a CaCu *in situ* y en 13 de las 14 lesiones de CaCu invasor (gráfica 5 y fig 10). La única negativa para este tipo, fue positiva para VPH tipo 18 (Gráfica 6 y fig 11). Para el caso de condiloma positivo a VPH no se evidenció la presencia del tipo 16 o 18 (tabla 2).

Diagnóstico clínico	Número de casos	Positivos para VPH MY09/11	Positivos para VPH L1C1/C2	Positivos para VPH Totales	Positivos para VPH 16	Positivos para VPH 18
NIC I	7	-	1 (14%)	1 (14%)	1	-
NIC II	10	-	2 (20%)	2 (20%)	2	-
CaCu <i>in situ</i>	20	5 (25%)	5 (25%)	7 (35%)	7	-
CaCu invasor	21	10 (47%)	13 (62%)	14 (66%)	13	1
Condiloma	2	1 (50%)	1(50%)	1 (50%)	-	-
Total	60	16 (26%)	22 (36%)	25 (41%)	23 (92%)	1 (4%)

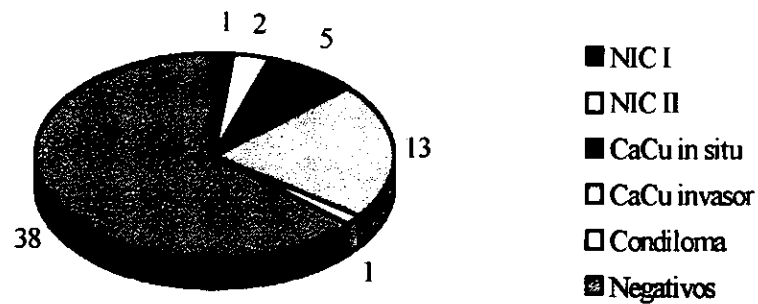
Tabla 2.- Clasificación y número de casos del diagnóstico clínico de los 60 biopsias obtenidas para este estudio, su diagnóstico molecular y el porcentaje de cada grado de malignidad parcial y global.

Diagnóstico Clínico



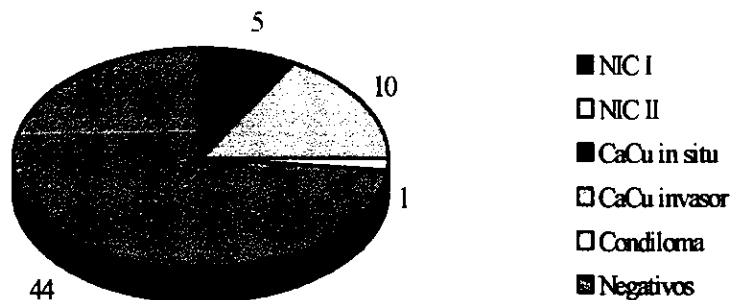
Gráfica 1.- Diagnóstico clínico de las 60 pacientes consideradas para el estudio. NIC I 7, NIC II 10, CaCu in situ 20, CaCu invasor 21 y 2 Condilomas.

Diagnóstico por L1C1/C2



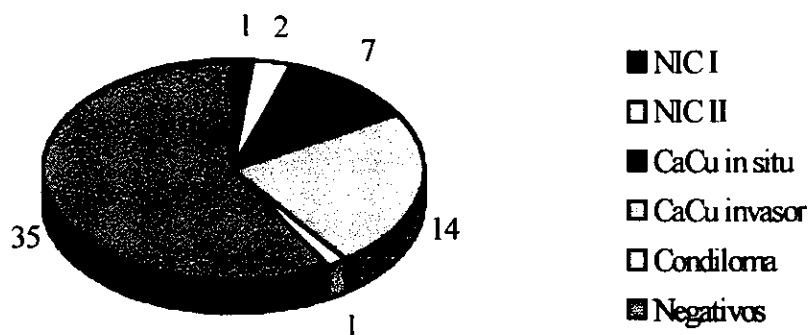
Gráfica 2.- Diagnóstico molecular de infección por VPH utilizando oligonucleótidos L1C1/C2: NIC I 1 caso, NIC II 2 casos, CaCu in situ 5 casos, CaCu invasor 13 casos, Condiloma 1 caso.

Diagnóstico por MY09/11



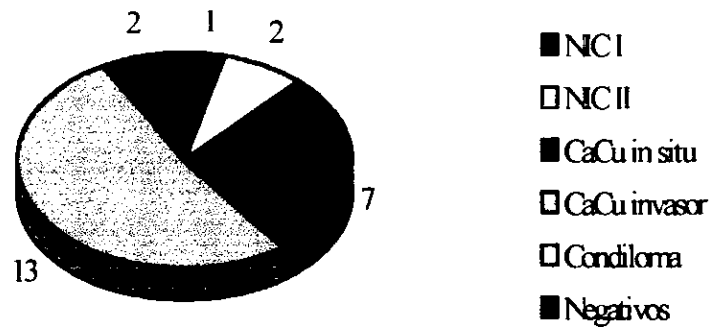
Gráfica 3.- Diagnóstico molecular de infección por VPH utilizando oligonucleótidos MY09/11: NIC I 0 casos, NIC II 0 casos, CaCu in situ 5 casos, CaCu invasor 10 casos, Condiloma 1 caso.

Diagnóstico por PCR



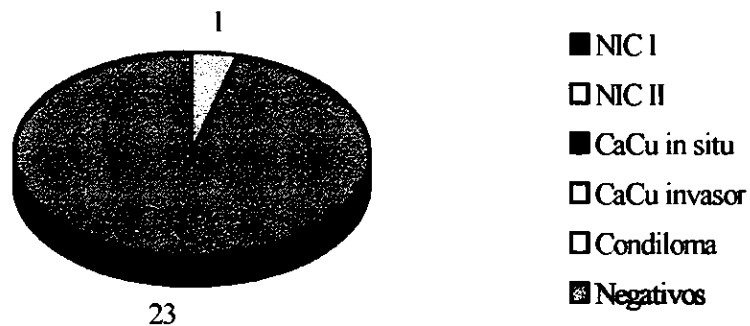
Gráfica 4.- Muestras diagnosticadas positivas por biología molecular: NIC I 1, NIC II 2, CaCu in situ 7, CaCu invasor 14, condiloma 1. Total 25.

Tipificación de VPH tipo 16



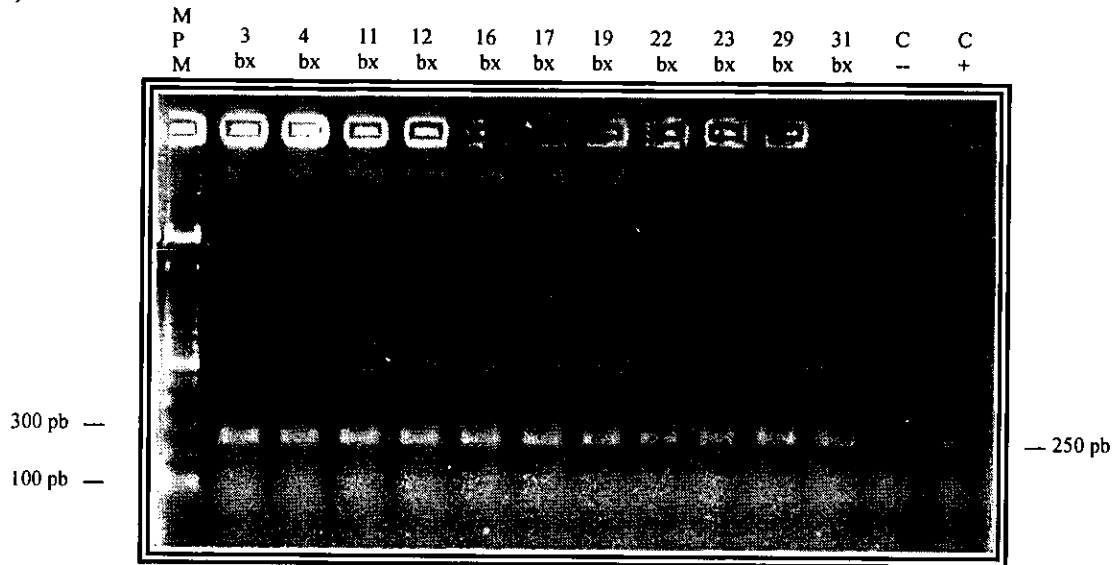
Gráfica 5.- Tipificación del VPH 16 en lesiones positivas a la infección: NIC I 1, NIC II 2, CaCu in situ 7, CaCu invasor 13, Condiloma 0.

Tipificación de VPH tipo 18



Gráfica 6.- Tipificación del VPH 18 en lesiones positivas a la infección: CaCu invasor 1.

A)



B)

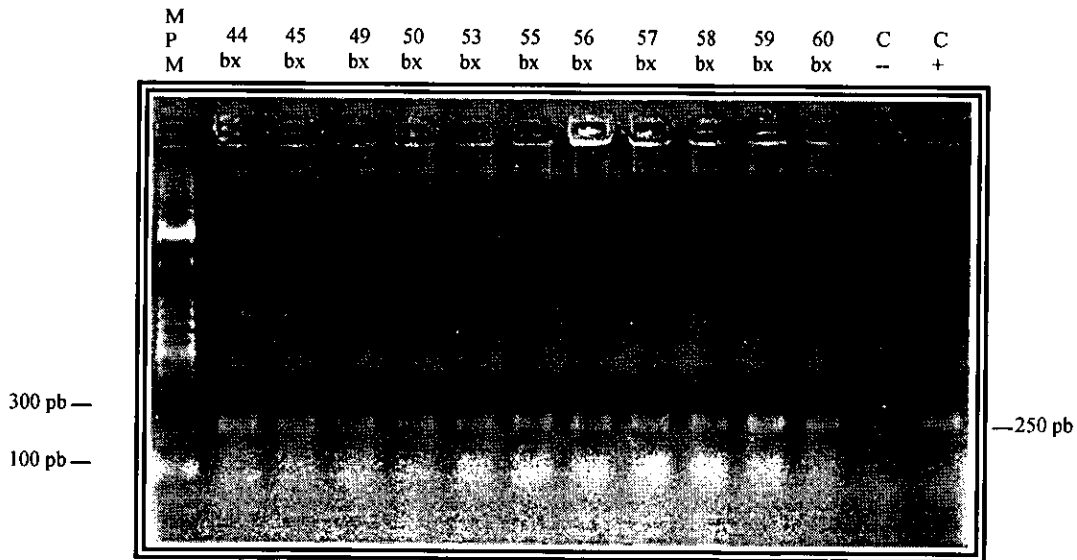
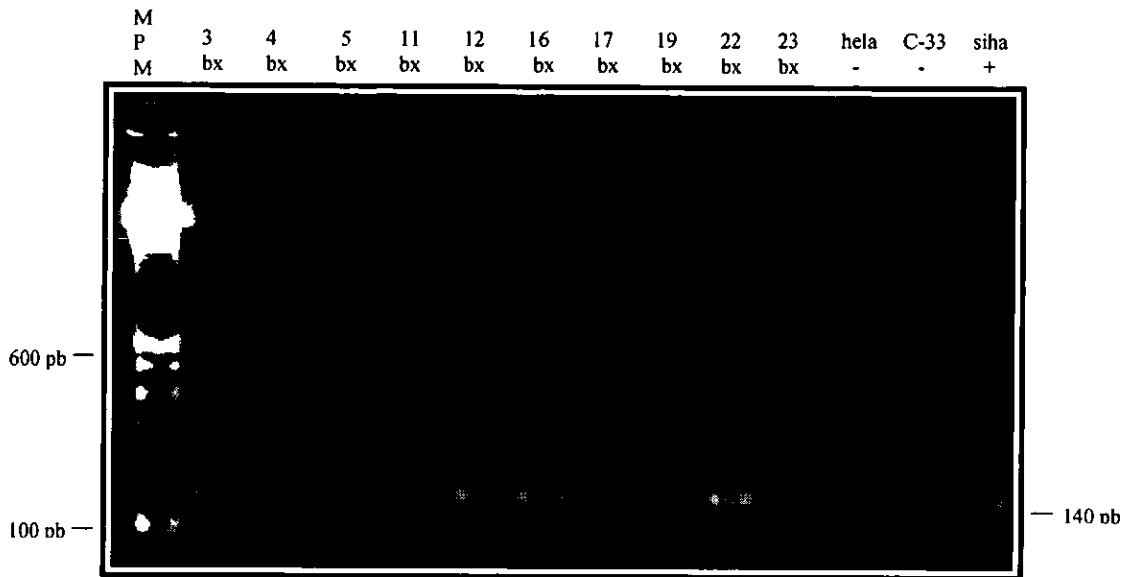


Fig 8.- A) y B) Amplificación del gen L1 del VPH por medio de los oligonucleótidos L1C1/ C2. Únicamente se muestran las pacientes positivas, el fragmento amplificado es de 250 pb. Marcador de peso molecular (M.P.M) de 100 pb, muestras positivas a la infección (bx), agua como control negativo (C-) y línea celular Hela como control positivo (C+).

A)



B)

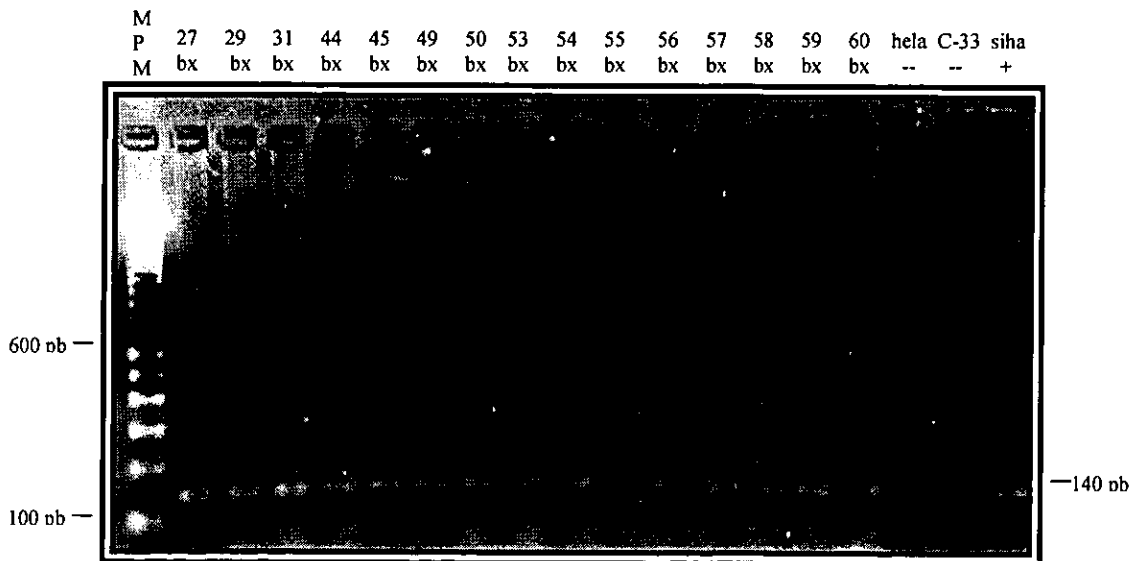


Fig10.- A) y B). Amplificación de un fragmento específico del gen E6 del VPH tipo 16. Diagnóstico para todas las biopsias positivas a VPH. Marcador de peso molecular (M.P.M), muestras (bx), Controles negativos: Líneas celulares Hela (VPH 18) y C-33 (negativa a VPH). Control positivo línea celular Siha (VPH16).

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El diagnóstico clínico de alteraciones pre-malignas del epitelio cervical y del CaCu debe ser oportuno y preciso en las fases iniciales de la enfermedad. Por lo tanto la apreciación tanto del ginecólogo como del patólogo idealmente deben coincidir para establecer el diagnóstico y ofrecer la mejor alternativa terapéutica. Es en este punto donde se debe aprovechar las herramientas de la biología molecular ya que la asociación reportada en numerosos trabajos, como este, de la infección del VPH con CaCu genera una alternativa de diagnóstico más precisa. Queda claro que no todos los CaCu tienen VPH pero personas que son positivas a esta infección tienen una alta probabilidad de desarrollar el cáncer. Si se puede disminuir este porcentaje habría un gran avance en su prevención.

El uso de técnicas de biología molecular en el diagnóstico de infección por VPH permite detectar la presencia del virus antes de que provoque cambios morfológicos en la célula infectada, dichos cambios son la manera de evidenciar las alteraciones cervicales en las técnicas convencionales tales como la colposcopia, papanicolaou, e histología (biopsia). La PCR es uno de los métodos más sensibles en la detección y tipificación del VPH, pero tiene la desventaja de ser un procedimiento de alto costo. Sin embargo, la utilidad clínica en el diagnóstico de infección por VPH en conjunto con métodos morfológicos, permite disminuir el número de falsos negativos e identifica mujeres con alto riesgo de desarrollar CaCu.

En este proyecto, mediante PCR se detectó DNA del VPH en 25 de 60 muestras, es decir un 41.6% (gráfica 4 y figs. 8 y 9), lo cual fue muy similar a resultados ya reportados utilizando técnicas diferentes (Mendoza et al 1994, Ordoñez et al 1993). Esta frecuencia menor a la reportada en trabajos de otros países puede deberse a diferentes factores, uno de ellos es que el estudio se realizó con una población abierta, es decir, se consideraron tanto lesiones precursoras como algunos casos establecidos de CaCu, incluso 21 pacientes habían sido histerectomizadas previamente. Una segunda causa es la génesis del CaCu debida a alteraciones genómicas que son muy frecuentes e independientes al VPH: Por ejemplo mutaciones somáticas en p53 son muy raras en aquellos positivos a VPH pero pueden ser frecuentemente detectadas entre los negativos a la infección. (Vousden, 1993). Esta distribución de mutaciones en p53 indican la importancia de la pérdida de las funciones de la proteína p53 silvestre en el desarrollo de estos cánceres ya sea por la expresión de la proteína E6 del VPH o por dichas alteraciones, resultando entonces la expresión de una proteína p53 mutante. Otra posibilidad es la existencia de alteraciones en otro anti-oncogen, Rb, que también se ha identificado como mutado en cánceres sin presencia de VPH. (Howley, 1991). Se han descrito también aberraciones cromosómicas que pueden alterar la expresión de ciertos genes, como c-myc y ras, modificando así drásticamente el ciclo celular favoreciendo entonces la formación de una neoplasia.

El diagnóstico molecular se hizo mediante un par de oligonucleótidos que flanquean regiones conservadas del gen L1 del VPH. Es importante mencionar que con los oligonucleótidos L1C1/C2 se evidenció DNA del VPH en todos los estadios estudiados, mientras que con los oligonucleótidos MY09/11 solo se pudo evidenciar en estadios avanzados como CaCu in situ e invasor.

Algunos casos fueron positivos para sólo un juego de oligonucleótidos, pero otros lo fueron para ambos. Estos resultados aportan el dato de que se deben utilizar diferentes juegos de oligonucleótidos para realizar un diagnóstico molecular confiable que hibriden y amplifiquen regiones tardías y tempranas del VPH, ya que aunque existen diferentes regiones reportadas como conservadas de los VPH al integrarse en el genoma de la célula huésped no se puede olvidar que es un evento al azar.

Se observó que la frecuencia de casos positivos para VPH se incrementa con la severidad de la lesión, es decir, solo 3 de 17 (17.6%) lesiones pre-cancerosas NIC I, NIC II fueron positivas, mientras en lesiones más avanzadas CaCu in situ y CaCu invasor 20 de 41 (51.2%) fueron positivas, esto indica que existen alteraciones en etapas tardías que favorecen la replicación viral (tabla 2 y gráfica 4). En las etapas tempranas aún no ha ocurrido la integración del genoma viral en el del huésped, por tanto no hay transcripción de proteínas virales con capacidad transformante (E6 y E7), pero si de proteínas como E1 y E2 que son responsables de la replicación viral. Dichas proteínas son Ag para el organismo por tanto se monta una respuesta inmune que es en un tiempo eficiente para eliminar células infectadas y así controlar por un periodo la infección (Alani, 1998). En etapas tardías, el genoma viral se ha integrado al de la célula huésped perdiendo la regulación de la transcripción que ejerce la proteína E2 sobre algunos genes, por tanto son expresadas las proteínas con capacidad transformante como E5 que puede alterar los mecanismos de la respuesta inmune, por ejemplo, la presentación y procesamiento de los ag a diferentes niveles, desde la transcripción de proteínas participantes hasta la alteración de estas por interacción con E5, lo cual favorece la evasión de la respuesta inmune anti-tumoral (Duggan, 1996). Por lo tanto, al estar presente las proteínas E6 y E7 se altera el ciclo celular inmortalizando las células infectadas, que no pueden ser reconocidas como malignas por el sistema inmune trayendo como consecuencia implante del tumor. Estudios recientes han encontrado otras alteraciones en etapas tardías, siendo las más común pero no la única, una aberración en el cromosoma 1, el cual esta translocado con otros (Stanley, 1996).

Al hacer la tipificación del VPH de los casos positivos se muestra una alta frecuencia del tipo 16, 23 de los 25 casos positivos (92%) son de este tipo (fig. 10). En contraste hay una frecuencia baja del tipo 18, 1 de 25 (4%) corresponden a este tipo (fig. 11). Para el caso de la muestra de condiloma o lesión de bajo grado no presentaba DNA de estos papilomas de alto riesgo por lo tanto debe corresponder a alguno de los VPH del tipo 6,11,31,33,36 que son considerados de bajo riesgo .

CONCLUSIONES

El diagnóstico molecular por PCR es una buena alternativa para detectar mujeres con alto riesgo de desarrollar cáncer por infección de VPH, pero no es la solución a este problema, por lo tanto son factibles otros marcadores que amplíen las alternativas de diagnóstico, abatan costos y reduzcan el porcentaje de resultados falsos negativos dados por métodos actuales.

Tanto el diagnóstico como la tipificación del virus son importantes para la prevención del CaCu.

La frecuencia de infección en lesiones pre-cancerosas y cancerosas del cervix es de 41%.

La frecuencia de infección por VPH va incrementándose con la severidad de la lesión: En lesiones de bajo grado NIC I el 14%, NIC II 20%, NIC III o CaCU in situ 35% y finalmente CaCu el 66%.

Mujeres mexicanas con diagnóstico positivo a VPH y alteraciones en el cérvix, tiene una alta probabilidad de infección por VPH tipo 16.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alani R.M, Münger K. (1998). Human Papillomaviruses. *Science & Medicine*. 5 (3): 28-35.
2. Baker F. (1996). A review of the importance of the p53 gene in cancer research. *Microsoft Internet Explorer*. 1-4.
3. Banks L, Matlashewski. (1996). Biochemical and biological activities of the HPV E5 proteins. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 39-45.
4. Botchan M, Grodzicker T, Sharp P. (1986). *DNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory. 17-36 p.p.
5. Burger M, Hollema H, Pieters W, Schröder F, Quint W. (1996). Epidemiological evidence of cervical intraepithelial neoplasia without the presence of human papillomavirus. *British Journal of Cancer*. 73, 831-836.
6. Cason J, Kaye J, Best J. (1996). Evidence for the transmission of human genital papillomavirus by non-sexual routes. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 281-289.
7. Cavenee W, White R. (1995). Bases Genéticas del Cáncer. *Investigación y Ciencia*. 44-51.
8. Connor M, Stern P. (1990). Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. *Int. J. Cancer*. 46, 1029-1034.
9. Chong. (1991). The enhancer of human papillomavirus type 16: Binding sites the ubiquitous transcription factor oct1, NFA, TEF-2, NF-1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. *J. Virology*. 65 (11): 5933-5943.
10. Cromme F, Meijer L, Snijders P, Uytendinck A, Kenemans P, Th Herhorst, Stern P, Brule A and Walboomers J. 1993. Analysis of MHC Class I and II Expression in Relation to Presence of HPV Genotypes in Premalignant and Malignant Cervical Lesions. *Br.J.Cancer* , 67 : 1372 - 1380
11. Cromme F, Snijders P, Brule A, Kenemans P, Meijer C and Walboomers J. 1993, MHC class I expression in HPV 16 positive cervical carcinomas is post-transcriptionally controlled and independent from c-myc overexpression. *Oncogene*, 8 : 2969 - 2975.
12. Cromme F, Brommel P, Walboomers J, Galle M, Stern P, Kenemans P, Helmerhorst J, Stukart M and Meijer L. 1994. Differences in MHC and TAP-1 expression in cervical cancer lymph node metastases as compared with the primary tumours. *Br. J. Cancer* 69: 1176 - 1181.

13. Croock T, Vousden K. (1996). HPV oncoprotein function. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 55-60.
14. Doorbar J. (1996). The E4 proteins and their role in the viral life cycle. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 31-38.
15. Dowhanick J, McBride A, Howley P. (1995). Suppression of Cellular Proliferation by the Papillomavirus E2 Protein. *Journal of Virology*. 69 (12): 7791-7799.
16. Duggan-Keen M, Keating P, Cromme F, Walboomers J, Stern P. (1996). Alterations in major histocompatibility complex expression in cervical cancer: Possible consequences for immunotherapy. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 141-150.
17. Fields B. (1990). *Virology*. 2^a ed. Raven Press. New York. 1651-1675.
18. Frazer I, Tindle R. (1996). Cell mediated immunity to papillomaviruses. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 151-163.
19. Fujinaga Y. (1991). Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *Journal of General Virology*. 72, 1039-1044.
20. García-Carrancá A. Y Gariglio P. (1993). Aspectos moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cervico-uterino. *Rev Inv Clin*. 45: 85-92.
21. Gariglio P, Ocadiz R, Saucedo R. (1987). Human Papillomavirus DNA Sequences and c-myc Oncogene Alterations in Uterine Cervix Carcinoma. *Cancer Cells/Papillomaviruses by CSHL*. 5: 343-348.
22. Gariglio P. (1995). Virus y Cáncer. *Ciencia y Desarrollo*. 65-74.
23. Glew S, Duggan-Keen M, Cabrera T, Stern P. (1992). HLA class II antigen expression in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Cancer Research*. 52, 4009-4016.
24. Gramza A. (1995). Efficient method for preparing normal and tumor tissue for RNA extraction. *Bio Techniques*. 18 (2): 228-231.
25. Guido M, Zamorano R, Garrido F, Gariglio P, García A. (1992). Early promoters of genital and cutaneous human papillomaviruses are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *Journal of General Virology*. 73: 1395-1400.

26. Hamel P, Phillips R, Muncaster M, Gallie B. (1993). Speculations on the roles of RB1 in tissue-specific differentiation, tumor initiation, and tumor progression. *The FASEB journal*. (7): 846-854.
27. Harris C. (1993). p53: At the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* 262, 1980-1981.
28. Howley P. (1991). Role of the Human Papillomaviruses in Human Cancer. *Cancer Research*. 51: 5019s-5022s.
29. Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M and Paavonen J. (1996). Human Papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. *Cancer*. 77 (11): 2275-2279.
30. Jochmus I, Altmann A. (1996). Immune response to papillomaviruses: Prospects of an anti-HPV vaccine. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 165-173.
31. Kast M, Feltkamp M, Rensing M, Vierboom M, Brandt R, Melief C. (1996). Cellular immunity against human papillomavirus associated cervical cancer. *Seminars in Virology*. 7: 117-123.
32. Klein G. (1993). Genes that can antagonize tumor development. *The FASEB journal*. (7): 821-825.
33. Lazcano E, Nájera P, Alonso P, Buiatti E, Hernández M. (1996). Programa de Detección Oportuna de Cáncer en México. *Cancerología*. 42 (3): 123-140.
34. Ludlow J. (1993). Interactions between SV40 large-tumor antigen and the growth suppressor proteins pRb and p53. *The FASEB journal*. (7): 866-871.
35. Maniatis T, Sambrook J, Fritsch E. (1989). *Molecular Cloning*. 2^a ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. (1): 6.3-6.20, (2): 9.16-9.22.
36. Manos M, Ting Y. (1990). Detection and Typing of Genital Human Papillomaviruses. *PCR Protocols*. 356-367.
37. Mendoza L, Lara M, Reynoso R, Ramírez J. 1994. Detección del papilomavirus humano en ADN de tejido normal y lesiones premalignas del cérvix por hibridación molecular. *Rev. del Inst Nal de Cancerología*, 40. 1 :8-13
38. Nakagawa S. (1996). Type of Human Papillomavirus Is Related to clinical Features of Cervical Carcinoma. *American Cancer Society*. 78 (9): 1935-1941.

39. Ordoñez R, Mendoza L, Reynoso R, Solorza G, Ramírez J, Meneses A y Mohar A. 1993. Papiloma virus humano en pacientes con cáncer cervico uterino en el Instituto Nacional de Cancerología. *Rev. del Inst Nal de Cancerología*, 39. 2 :1809-1813.
40. Park T, Fujiwara H, Wright T. (1995). Molecular biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer*. 76, 1902-1913.
41. Rangel L, Ramirez M, Torroella M, Pedroza A, Ibarra V, Gariglio P. (1994). Multistep carcinogenesis and genital papillomavirus infection. Implications for diagnosis and vaccines. *Archives of Medical Research*. 25 (2): 265-272.
42. Razvi E, Welsh R. (1995) Apoptosis in viral infections. *Advances in virus research*. 45, 1-60.
43. Santos E, Rodriguez J. (1986). *El Cáncer*. Libros de investigación y ciencia. Prensa científica. Barcelona. 1-9 p.p.
44. Schneider A. (1996). Genital HPV infections. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 207-214.
45. Shimada M, Fukushima M, Mukai H, Kato I, Nishikawa A and Fujinaga R. 1990. Amplification and specific detection of transforming gene region of human papillomavirus 16, 18 and 33 in cervical carcinoma by means of the polymerase chain reaction. *Jpn. J. Cancer Research*. Jan , 81 : 1 -5.
46. Stern P. (1996). Immunity to Human Papillomavirus-Associated Cervical Neoplasia. *Advances in Cancer Research*. 69: 175-211.
47. Syrjänen K. (1996). Natural history of genital human papillomavirus infections. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 189-206.
48. Taja L, Salcedo V, Osorio A. (1996). Presencia de la proteína tardía del papilomavirus humano en tejido cervico-uterino con lesiones de bajo y alto grado de malignidad. *Cancerología*. 42 (4): 181-187.
49. Thierry F. (1996). HPV Proteins in the Control of HPV Transcription. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 21-29.
50. Tzyy C. (1994). Immunology of the human papilloma virus in relation to cancer. *Curren Opinion in Immunology*. 6: 746-754.
51. Ulrike W, Herbert P. (1996). Molecular Diagnosis of Persistent Human Papillomavirus Infections. *Intervirology*. 39: 145-157.

52. Vousden K. (1993). Interactions of human papillomavirus transforming proteins with the products of tumor suppressor genes. *The FASEB journal*. (7): 872-879
53. Vousden K. (1994). Interactions between papillomavirus proteins and tumor suppressor gene products. *Advances in Cancer Research*. 64, 1-19.
54. Wiman K. (1993). The retinoblastoma gene: role in cell cycle control and cell differentiation. *The FASEB journal*. (7): 841-84.
55. Wright T, Kurman R. (1996). A critical review of the morphologic classification systems of preinvasive lesion of the cervix: the scientific basis for shifting the paradigm. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 215-225.
56. Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K. (1991). Detection and typing of multiple genital HPVs by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res*. 82: 524-531.
57. Zambetti G, Levine A. (1993). A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. *The FASEB journal*. (7): 865-885.
58. Zhou J, Frazer I. (1996). Papovaviridae: Capsid structure and capsid protein function. *Papillomavirus Reviews: Current Research on Papillomaviruses*. 93-100.
59. Zur Hausen H. (1980). DNA tumor viruses. *Molecular biology of tumor viruses*. Second edition. Part 2. Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor New York. 371-401.
60. Zur Hausen. (1991). Virus in human cancer. *Science*. 224, 1167-1173.
61. Zur Hausen (1994). *Papillomavirus Infections a Major Cause of Human Cancers*. 71p