



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

DETERMINACION DE LA SECUENCIA DEL GEN E1 DE
VARIANTES DEL VIRUS PAPILOMA HUMANO 16,
AISLADAS DE MUJERES MEXICANAS CON CANCER
CERVICOUTERINO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
MA. CRISTINA AMADA VELEZ DEL VALLE

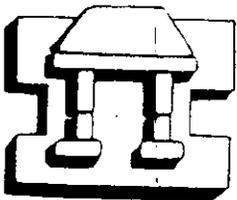
DIRECTORES: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS

M. EN C. SILVIA C. GALVAN HUERTA

SINODALES: DR. DIEGO ARENAS ARANDA

M. EN C. RAFAEL JIMENEZ FLORES

DR. SERGIO VACA PACHECO



IZTACALA

LOS REYES, IZTACALA

SEPTIEMBRE DEL 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mi madre:

**por las grandes enseñanzas en vida,
y la enorme lección de su ausencia.**

A mi padre:

**por el inconmensurable valor de su
compañía.**

A mis hermanos:

**Josefina, Luz María, Enrique y Teresa
por no perder la fé.**

**La vida no es como una pintura que se
construye a punta de brochazos suaves; es
como una escultura que se forja a punta de
golpes de cincel y martillo.**

Ivan Guirior

¡GRACIAS!

A la M. en C. Rosa Ma. Ordoñez por sus enseñanzas y apoyo.

También a todos los compañeros y amigos del laboratorio de Biología Molecular: Alberto, Arturo, Laura, Leonora, Lucy, Luz, Mario, Nora, Pily, Rocío y Silvia, por todo lo que nos toco compartir.

A mis compañeras de la carrera y amigas para toda la vida cuyo ejemplo me motivo para no dejar de intentarlo: Lorena, Miriam, MaryTere, Ivonne y Piyusa.

A Meytha, Alicia y Yesennia, por su apoyo incondicional.

Este trabajo se llevo a cabo en la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, bajo la dirección del Dr. Jaime Berumen Campos y la M. en C. Silvia Galván H.

INDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	3
Virus del papiloma humano (VPH). _____	4
Estructura del genoma viral.	4
Nomenclatura y taxonomía.	6
Ciclo viral	7
Replicación	9
Antecedentes directos _____	11
1 OBJETIVO	13
2 MATERIAL Y MÉTODO	13
Materiales _____	14
Material biológico.....	14
Reactivos.....	14
3 Métodos _____	15
Diseño de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR.	15
Amplificación del gen de E1 por la técnica de PCR.....	16
Preparación de las muestras para secuenciación.....	19
Secuenciación del gen de E1 por PCR.	22
4 RESULTADOS	25

Amplificación del gen e1 por la técnica de PCR.....	25
Determinación de la secuencia del gen de E1.....	29
5 ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
CONCLUSIONES.....	42
BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN

En este trabajo caracterizamos el gen *e1* de dos variantes del VPH16, denominadas AA-a y AA-c, a partir de la amplificación del ADN integrado en tumores de pacientes mexicanas con CaCU.

En total se identificaron 29 cambios nucleotídicos. De ellos 28 correspondieron a la variante AA-a y 27 a la variante AA-c, lo que equivale al 1.45% de los 1950 nucleótidos secuenciados en ambos casos. Aunque existe un cambio en la secuencia de nucleótidos, respecto de la referencia, que es específico del gen *e1* para la variante AA-a y dos específicos para el gen *e1* variante AA-c la predicción de ambas proteínas indica que dichos cambios dan lugar a 11 sustituciones de los aminoácidos codificados, lo que corresponde al 1.9 % de los 650 aminoácidos que constituyen a la proteína, los demás cambios no repercuten en la secuencia de aminoácidos.

Las divergencias de secuencia encontradas, fueron ubicadas en las regiones funcionales de la proteína y se discuten sus posibles implicaciones en el comportamiento de las variantes.

INTRODUCCIÓN

El Cáncer Cervico-Uterino (CaCU) representa la segunda forma más común de cáncer en el mundo. Las tasas de incidencia varían de manera importante entre los diferentes países y son más altas en los países en vías de desarrollo.

En México este cáncer, es uno de los principales problemas de salud pública. Aunque en 1994 se estimó para 1995 una tasa de mortalidad nacional de 21.8 por cada cien mil mujeres de más de 15 años de edad (Hernández-Ávila et al., 1997), en ese año la incidencia fue de las más altas en el mundo: 50 defunciones por cada cien mil mujeres (Lazcano et al., 1996) y se han detectado de 12,000 a 16,000 nuevos casos por año. Se estima que del medio millón de casos que ocurren anualmente en el mundo aproximadamente el 80% tienen lugar en los países en vías de desarrollo.

Algunos Virus de Papiloma Humano (VPH) están asociados con el CaCU y han sido detectados entre el 90 y el 95% de los casos de CaCU, mientras que en la población en general la prevalencia de los VPH, estimada por estudios de casos y controles, se encuentra en el rango del 5% al 20% (Bosh et al., 1995; Muñoz et al., 1994).

De los cerca de 20 tipos diferentes de VPH que han sido detectados en CaCU, el VPH16 es el más común registrándose hasta en un 50% de los casos de

CaCU (Bosh et al., 1995). Sin embargo, el VPH16 es también el tipo viral más común hallado en la población con citología normal del cuello uterino (Morrison, 1994) y sólo una minoría de las mujeres infectadas con este tipo de virus, desarrollan CaCU.

Virus del papiloma humano (VPH).

Los virus del papiloma humano pertenecen a la familia de los Papovaviridae y son pequeños virus de ADN, de cadena doble, que infectan los epitelios superficiales por los cuales presentan un tropismo específico (Howley, 1991). La mayoría de los tipos virales causan lesiones benignas (verrugas) de bajo riesgo, pero algunos mucosotrópicos se asocian con lesiones malignas o tumores epiteliales.

Los VPH son pequeñas partículas icosaédricas, con cápside, sin envoltura, de aproximadamente 52 a 55 nm de diámetro. Tienen 72 capsómeros (60 hexámeros y 12 pentámeros) arreglados en una malla (Pfister et al., 1977; Faras et al., 1980).

Estructura del genoma viral.

El genoma de los VPH posee entre 7000 y 8000 pb y se encuentra en forma circular súper enrollada dentro del virión. Se asocia a histonas celulares, formando un complejo similar a la cromatina y presenta más de ocho aproximadamente marcos de lectura abierta (ORF).

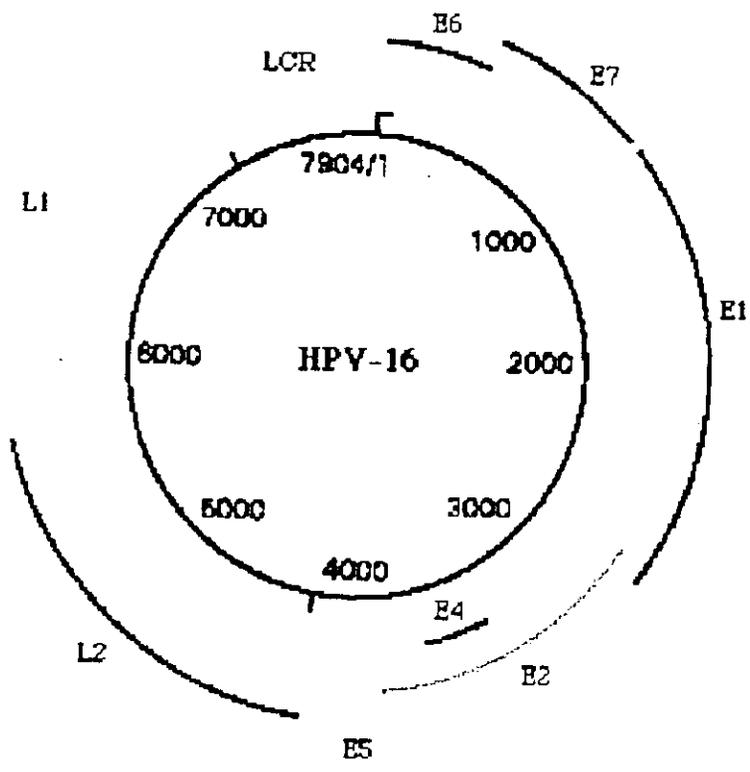


Figura 1. Diagrama de la organización genómica del VPH16. En el centro se esquematizan los nucleótidos y en el exterior las ORF de las diferentes proteínas.

La expresión ocurre sobre una sola hebra del ADN que es activa durante la transcripción (Wieland y Pfister, 1996). El genoma se encuentra organizado de manera espacial y temporal, puede dividirse en tres regiones esquematizadas en la Figura 1. Una región no codificadora de 1000 pb que regula la transcripción y contiene al origen de replicación denominada la Región Larga de Control (LCR), una región de genes tempranos (E) que codifica para proteínas involucradas con la persistencia del genoma, la replicación del ADN y la activación del ciclo lítico y por último, una región tardía (L) que codifica para las proteínas estructurales. La regulación de la expresión del genoma viral es compleja y se encuentra controlada tanto por factores virales como celulares.

Nomenclatura y taxonomía.

Se han identificado más de 80 tipos de VPH, la mitad de los cuales se ha asociado a lesiones del tracto anogenital. Los VPH se pueden clasificar en tres grupos: los de alto, de moderado y de bajo riesgo. Los considerados de bajo riesgo dan lugar a lesiones benignas, mientras que los de alto riesgo, están implicados en el CaCU; dentro de estos últimos se encuentran los VPH16, VPH18, VPH31, VPH33 y VPH45 (zur Hausen, 1991).

La designación de un tipo viral no esta basada en la caracterización serológica, ya que las partículas virales de VPH no están fácilmente disponibles para generar inmunización y producir anticuerpos específicos. La tipificación depende entonces de la homología en la secuencia del ADN.

Hasta antes de la conferencia anual de virus de papiloma de 1995, se consideraba que más de un 10% de diferencia al comparar entre las ORF de *e6*, *e7* y *11*, era suficiente para definir nuevos tipos de virus (Van Rast, 1993); sin embargo, a partir de dicho evento, se circunscribió la determinación de un nuevo tipo a diferencias mayores al 10% detectadas en el gen *11* respecto de la secuencia del virus prototipo.

Si un VPH varía lo suficiente como para permitir diferencias que no dan lugar al reconocimiento de otro tipo viral, pero sí cuentan con un margen de homología de entre el 90 y el 98% se consideran un subtipo y con homologías mayores al 98% una variante. Tanto el subtipo como la variante presentan estabilidad entre aislados (Wheeler e Icenogle, 1995)

Para el VPH16 han sido reportadas seis ramas filogenéticas distintas o clases variantes (Chan et al., 1992 y Ho et al., 1991 y 1993, Yamada et al, 1997) designadas como: E (Europea), As (Asiática), AA (Asiático-Americana), Af1 (Africana-1), Af2 (Africana-2) y NA (Norteamericana). Estas variantes se encuentran correlacionadas fuertemente con su distribución geográfica.

Ciclo viral

El estudio detallado del ciclo de los VPH ha sido particularmente difícil, ya que se carece de un sistema celular que permita recrear de manera estable las condiciones biológicas para que se induzca el ciclo viral completo. Por ello,

buena parte de la información proviene de los virus de papiloma bovino y de líneas celulares desarrolladas de biopsias de pacientes infectados.

El ciclo de los VPH depende de la diferenciación de las células epiteliales del hospedero y puede ser separado en dos etapas: una no productiva y una productiva.

La etapa no productiva se lleva a cabo en la capa basal del epitelio, donde se piensa que el virus llega gracias a una lesión. Una vez en el compartimiento basal, el virus se establece como una estructura episomal, se replica a sí mismo utilizando la maquinaria celular y establece una fase latente de infección. La etapa productiva se lleva a cabo en las capas suprabasales del epitelio. Una vez que se reinicia la amplificación del ADN viral (Flores y Lambert, 1997), las proteínas tardías se sintetizan y se ensamblan las partículas virales que se liberarán subsecuentemente al descamarse el epitelio (Flores, et al, 1999).

Al inicio del ciclo viral, una combinación particular de factores celulares que interactúan con la LCR promueven la transcripción temprana de los oncogenes virales *e6* y *e7* (Di Paolo, 1993). Éstos favorecen la división celular interrumpiendo los mecanismos de control: *E6* se une a la proteína supresora de tumor *p53* y *E7* se une a la proteína *p105-RB+*. La continuidad en la transcripción de los genes tempranos conlleva al aumento gradual de las proteínas virales *E1* y *E2*. La proteína *E2* impide la transcripción de los genes

tempranos y confiere especificidad de unión a E1, la cual promueve la replicación viral. El cese paulatino de la transcripción de los oncogenes virales a través de la represión por E2, libera la regulación del ciclo celular mediada por p53 y p105-RB+, permitiendo que la diferenciación celular progrese. Es entonces cuando el promotor tardío funciona y se producen las proteínas de la cápside viral L1 y L2, permitiendo la maduración de viriones en los estratos superiores del epitelio.

La disrupción del gen *e2* durante un evento de integración del genoma viral en un cromosoma celular, impide la progresión del ciclo viral y la entrada del programa de diferenciación de la célula epitelial, favoreciendo la transformación celular producida por E6 y E7 (zur Hausen, 1996).

Replicación

Los estudios de expresión en sistemas libres de células permitieron definir los productos del genoma viral y las secuencias necesarias para la replicación viral. Hicieron evidente que las proteínas E1 y E2 son los únicos factores virales requeridos para la iniciación de este proceso (Ustav y Stenlund 1991; Ustav et al., 1991; Yang et al., 1991; Chiang et al., 1992; Kuo et al., 1994).

La proteína E1 es una fosfoproteína nuclear con un peso aproximado de entre 70 y 80 Kd; se une al ADN de manera específica e inespecífica, sobre la LCR. La especificidad de enlace es mediada por la proteína E2, la cuál, además,

incrementa la afinidad de E1 por el ADN (Berg, y Stenlund, 1997). Entre las actividades específicas de la proteína E1 se encuentran la de helicasa, de ATPasa y su función como modulador de la replicación a través de su interacción con la subunidad alfa de la ADN-polimerasa.

La interacción entre las proteínas E1-E2 es importante para la replicación del ADN del VPH16 (Kasukawa, et al, 1998). La presencia de E2 es necesaria para que E1 se enlace de manera específica al origen de replicación (*ori*), lo que apunta a que el reconocimiento inicial del *ori* está determinado por E2 (Masterson et al, 1998). Esta interacción es altamente específica ya que las quimeras de E1 y E2 entre distintos tipos de VPH presentan diferentes actividades relativas de replicación en ensayos de interacciones funcionales (Zou et al., 1998).

De acuerdo con Lee, et al. (1999), las proteínas E1 y E2 del VPH18 y el factor celular IniI/Hsnf5 forman un complejo ternario *in vitro*, que es importante para replicación del ADN viral. El factor IniI/Hsnf5 es un componente del complejo SW1/SNF y este último es esencial para la activación de la transcripción de promotores inducibles: desestabiliza la estructura de la cromatina a nivel de promotores y facilita el acceso de la maquinaria transcripcional; el complejo SW1/SNF media la interacción entre activadores transcripcionales gene específicos y los factores generales de la transcripción, facilitando el acceso de la maquinaria transcripcional a la cromatina (Kalpana,

1994). Es probable que el complejo SW1/SNF esté involucrado en la primera aproximación del complejo viral para el reconocimiento del *ori*.

Se conoce poco del proceso de replicación; se piensa que el complejo proteico formado por E1:E2 es replicativamente inactivo, ya que antes que comience la síntesis de la nueva hebra de ácido nucleico, E2 se desliga del origen, al que se unen moléculas adicionales de E1 que conforman un hexámero; éstas, junto con los factores celulares promueven la formación de la horquilla replicativa, lo que da inicio a la síntesis de la nueva hebra de ADN (Sverdup y Myers, 1997). La presencia de E1 también es necesaria para la elongación *in vitro* (Liu et al., 1995).

Antecedentes directos

Se ha propuesto que algunas variantes del VPH16 se han asociado con lesiones de alto grado o cánceres histológicamente más agresivos (Zehbe, et al., 1998; Xi, et al,1997; Stoppler, et al, 1996 y Ellis, et al., 1995). De hecho la incidencia de cáncer cervical es diferente en los diversos países (Di Luca, et al, 1986, Yang, et al, 1997) y puede asociarse con la distribución de variantes virales específicas debido a que éstas tienen distribuciones geográficas distintas. Las variantes Asiático Americanas (AA) se encuentran principalmente en Centro y Sudamérica y en España, las variantes Africanas (Af) en África, las variantes asiáticas (As) en el Sudeste de Asia y las

variantes Europeas (E) en todo el mundo excepto África (Yamada et al., 1997).

Los estudios sobre variantes de los VPH genitales se han dirigido hacia el establecimiento de relaciones filogenéticas intra e ínter-típicas con base en la información de sus secuencias; estos estudios se han dirigido principalmente a los VPH16 y 18 (Icenogle et al., 1991; Yamada et al., 1995 y 1997). Se conoce poco de las posibles relaciones entre los cambios específicos en las secuencias y las características de las manifestaciones patológicas; además las investigaciones se han limitado a las ORF de las proteínas E2, E6, E7 y L1, y a la LCR (Fujinaga et al., 1994; Ellis et al., 1995; ter Meulen et al., 1993 e Icenogle et al., 1991).

Algunas variantes génicas, permiten suponer que hay cambios en la función de la proteína codificada, como sucede con una variante de la L1 que afecta el ensamble de la cápside viral (Yamada et al., 1995) o con algunas variantes de E6 que muestran diferencias en la actividad de inmortalización y en la degradación de p53 (Stoppler et al., 1996).

En estudios recientes realizados en el laboratorio del Dr. Jaime Berumen Campos de la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, se ha explorado la prevalencia de variantes del VPH16 en pacientes mexicanas. Se encontró una prevalencia alta de las variantes AA-a y AA-c, ya que infectan casi al 45% de los carcinomas positivos para el VPH16. También predominan en mujeres

menores a 35 años. La edad promedio de las mujeres positivas para las variantes AA, fue alrededor de 7 años menor que la de las mujeres que presentaron la variante de referencia Europea.

Dado que la secuencia del gen *e1* no se ha incluido en la determinación de los tipos y las clases virales, que las variantes encontradas en la población mexicana parecen tener un comportamiento particular: permanecen en forma episomal, en gran número de copias en los carcinomas y afectan de manera preferencial a las mujeres más jóvenes, se hace relevante la necesidad de caracterizar el gen *e1* y la proteína que codifica, para identificar cambios con posible relevancia funcional.

En una primera etapa que es motivo de esta tesis, se secuenciaron los genes *e1* de las variantes AA-a y AA-c.

OBJETIVO

Identificar los cambios nucleotídicos que repercuten en la secuencia de la proteína E1 y proponer el posible efecto de esas sustituciones en su actividad.

MATERIAL Y MÉTODO

Materiales

Material biológico.

Se obtuvieron muestras de tejido canceroso por biopsia abierta directa de 123 pacientes con cáncer cervical invasor, diagnosticadas entre enero y junio de 1992 en el Hospital de Oncología, Centro Medico Nacional, IMSS de la Ciudad de México,. Once fueron identificadas como infectadas por variantes Asiático-Americanas del VPH16 de las subclases AA-a (6) y AA-c (5). Para este trabajo se seleccionaron cuatro de esas muestras, dos pertenecientes a cada variante del VPH16.

Reactivos.

Los reactivos utilizados en los procedimientos se adquirieron de las siguientes compañías:

De GIBCO, BRL, los oligonucleótidos utilizados como iniciadores, los desoxinucleótidos trifosfato (dNTP), el $MgCl_2$, la Taq ADN polimerasa y su amortiguador de reacción 10X, así como la agarosa ultra pura y el marcador de pesos moleculares 1 Kb plus.

De Qiagen Inc., Valencia CA, el paquete para purificar ADN denominado QiaexII, que incluye las soluciones Qiaex 1, 2 y 3.

De Perkin-Elmer, las columnas CentriSep y el paquete BigDye Terminator Ready Reaction, utilizado para la secuenciación automática, cuya mezcla de reacción contiene $MgCl_2$, buffer Tris HCl, pH 9.0, desoxi-nucleótidos trifosfato, A-"Dye Terminator" marcado con dicloro (R6G), C-"Dye Terminator" marcado con dicloro (ROX), G-"Dye Terminator" marcado con dicloro (R110), T-"Dye Terminator" marcado con dicloro (TAMRA) y la Taq ADN polimerasa FS (pirofosfatasa estable a altas temperaturas).

De SIGMA Aldrich Chemical Co., se obtuvieron reactivos utilizados para la preparación de amortiguadores como el TBE (Tris 50 mM, Ácido Bórico 50 mM y EDTA 2.5 mM) y el bromuro de etidio.

De Bio Rad, los colorantes del amortiguador de muestra para la electroforesis conteniendo azul de bromofenol 25mM y xilen-cianol 25mM.

Métodos

Diseño de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR.

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) requiere para llevarse a cabo, la presencia de desoxi-oligonucleótidos iniciadores (oligonucleótidos), que permitan a la enzima reconocer un sitio de doble hélice e iniciar la síntesis de la cadena complementaria a partir del iniciador. El resultado es un incremento en la concentración de la molécula de interés (amplificación).

El diseño y la selección de los oligonucleótidos está en función de la molécula que va a ser amplificada. Para este trabajo, se diseñaron seis pares de oligonucleótidos que amplifican fragmentos discretos de entre 300 y 400 bases, en ambas direcciones. La localización de los oligonucleótidos se muestra en la Figura 2.

Las secuencias de los oligonucleótidos se basaron en la reportada para el gen *e1* del VPH16 de referencia. En todos los casos se buscó que la diferencia entre las temperaturas de alineación de cada par de oligonucleótidos no excediese los 10°C y sus dimensiones no fueran menores a 20 bases para asegurar el apareamiento específico con la secuencia del gen. Además, utilizando el paquete Oligo (versión 4.1) se verificó que los oligonucleótidos no alinearan con ninguna otra región del VPH16, y que tampoco tuviesen alineamientos sobre sí mismos o con la pareja respectiva. Las secuencias, así como las temperaturas de alineación de los oligonucleótidos aparecen en las tablas I y II.

Amplificación del gen de E1 por la técnica de PCR.

La amplificación del gen *e1* completo de los VPH16 variantes se llevó a cabo con los oligonucleótidos externos (F811 y R2844), cuya posición se muestra en la figura 2. Las reacciones de PCR se hicieron utilizando 500 ng de cada muestra de ADN, en un volumen total de 50 µl. La solución contenía: 1U de

Taq polimerasa, una concentración final de Tris-HCl 20 mM (pH 8.0), MgCl₂ 1.5 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, 2 mM de la mezcla de dNTP (conteniendo dATP, dTTP, dGTP y dCTP) y 1 μM de cada oligonucleótido.

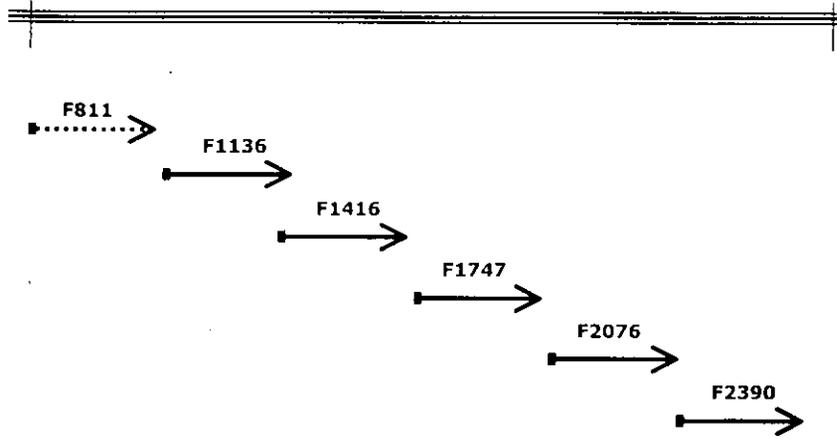
La PCR para la amplificación del gen *e1* completo se llevo a cabo en un termociclador Gene-Amp Sistema 9600 (Perkin Elmer); consistió en 40 ciclos de amplificación en las siguientes condiciones: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 60 segundos de alineación a 51°C y 2 minutos de extensión a 72°C. El bloque de 40 ciclos fue precedido por una desnaturalización de 3 minutos a 94°C, y finalizado con una extensión de 10 minutos a 72°C.

Una vez que se completaron las reacciones de PCR, se tomaron alícuotas de 20 μl, se mezclaron con amortiguador de muestra y se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE y bromuro de etidio (0.5 μg/ml).

Los geles se sumergieron en TBE y se sometieron a 100 voltios durante una hora. Los fragmentos teñidos se observaron en un transiluminador con luz ultravioleta.

Las manipulaciones del ADN de las muestras y el manejo de las mezclas de los reactivos de PCR, se efectuaron en áreas del laboratorio separadas, con equipo y materiales utilizados exclusivamente para cada propósito; esto con la finalidad de prevenir la contaminación de los reactivos y/o de las muestras.

LOCALIZACIÓN DE LOS PRIMERS (DIRECTOS) PARA SECUENCIAR *e1* DE VPH16



LOCALIZACIÓN DE LOS PRIMERS (REVERSOS) PARA SECUENCIAR *e1* DE VPH16

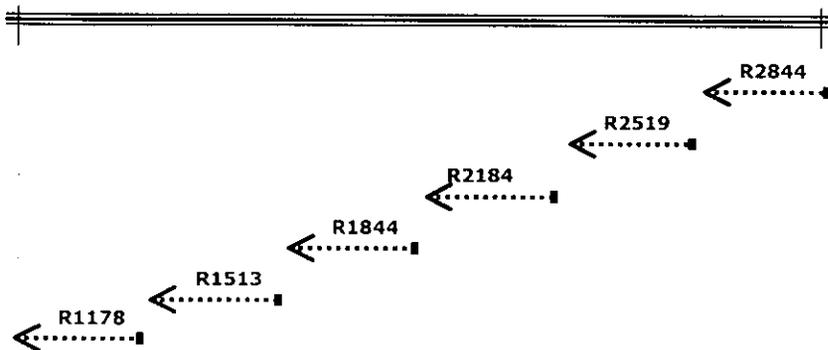


Figura 2. Esquema de localización de los oligonucleótidos diseñados para abarcar la secuencia completa del gen *e1*.

En cada reacción se colocaron dos controles; uno positivo, conteniendo ADN del VPH16 prototipo y el otro negativo, con ADN humano proveniente de muestras de sangre.

Preparación de las muestras para secuenciación.

Las bandas correspondientes a los fragmentos de ADN, obtenidos por PCR se cortaron del gel y se purificaron usando el paquete Qiaex II.

El paquete Qiaex tiene como fundamento la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva del ADN a las partículas de sílica gel de Qiaex en presencia de concentraciones elevadas de sal. El fragmento de gel se solubilizó a 50°C con el amortiguador Qiaex1, el cual contiene una concentración alta de perclorato de sodio. Se adicionó solución Qiaex2, que contiene el sílica gel y para eliminar los posibles contaminantes de agarosa se hicieron dos lavados más con la solución Qiaex 3, que contiene etanol, con lo que se precipita el ADN y en el sobrenadante se remueven las sales residuales. El precipitado generado se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de agua bidestilada estéril. Se eluyó a 50°C y se centrifugó en una microcentrifuga a máxima velocidad durante 3 minutos para sedimentar las partículas de la resina Qiaex; el ADN eluido se recuperó del sobrenadante. Las partículas de la resina fueron sometidas a una segunda elución, con la finalidad de recuperar la mayor cantidad posible del ADN.

Secuencia 5'→3'	Localización	No. de bases	Temperatura de alineación (°C)
ATGGGCACACTAGGAATTGT	F811	20	58
TGGGTAGTCCACTTAGTGA	F1136	19	56
CACTATATGCCAAACACCA	F1416	19	54
TCTAAACTATTATGTGTGT	F1747	19	48
TTGTGCAACAATGTGTAGA	F2076	19	52
GGTTACAACCATTAGCAGA	F2390	19	54

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para amplificar en dirección 5'→ 3' y secuenciar el gen de E1 del VPH16.

Secuencia 3'→5'	Localización	No. de bases	Temperatura de alineación (°C)
TTATTGTCTACACATCCACT	R2844	20	58
CTATGCTTTACATCCATAGA	R2519	19	54
CTTCCAATCACCTCCATCAT	R2184	19	58
GATATACCTGTTTTATACCA	R1844	19	52
CCCCGTATAACTCTTTAAAT	R1513	19	54
TTATTGTCTACACATCCACT	R1178	19	54

Tabla II. Oligonucleótidos utilizados para amplificar en dirección 3'→ 5' y secuenciar el gen de E1 del VH16.

Secuenciación del gen de E1 por PCR.

Las muestras purificadas de ADN se secuenciaron en ambas direcciones por el método de ciclo fluorescente. En las reacciones de secuenciación se usaron los oligonucleótidos descritos en las tablas I y II para abarcar toda la molécula.

La preparación de las muestras y las reacciones de PCR se hicieron de la siguiente forma: en un tubo eppendorf para microcentrifuga se añadieron 8 μ l de la mezcla de reacción perteneciente al paquete Big Dye Terminator. La marca de los reactivos utilizados es altamente sensible; contienen un colorante donador de fluoresceína ligado a un colorante aceptor de diclororrodamina. Se agregaron de 30 a 90 ng de la muestra de ADN limpia, 3.2 pmoles del oligonucleótido para utilizarse en la secuenciación y agua desionizada para completar un volumen final de 20 μ l. La máxima excitación del colorante marcado corresponde al donador de fluoresceína y el espectro de emisión es el del aceptor de diclororrodamina. El colorante donador se encuentra optimizado para absorber la energía de activación del láser del ión argón en los instrumentos del secuenciador.

La amplificación del ADN se hizo por PCR durante 25 ciclos en el termociclador. Cada ciclo consistió en: 10 segundos de desnaturalización a 96°C, 5 segundos de alineación a 50°C y 4 minutos de extensión a 60° C.

Los productos de cada amplificación se purificaron en columnas Centri-Sep (Perkin Elmer) como sigue. Se ensambló la columna y se vertieron a través de

ella 2 ml de agua desionizada, se permitió que se hidratara durante 30 min. y se drenó el líquido por centrifugación a 3000 rpm durante 4 minutos, para compactar la columna. Se vertió todo el producto de PCR y se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos. Se colectaron aproximadamente de 40 a 60 μ l de la muestra y se secaron en una centrifuga de vacío por 10 o 15 minutos, hasta aproximadamente la mitad del volumen.

El análisis por electroforesis de las secuencias se hizo en forma automatizada en un secuenciador ABI PRISM 310 (Perkin-Elmer). El procedimiento es como sigue: los fragmentos se introducen dentro de un capilar lleno de un polímero preformulado. Los fragmentos de ADN marcado migran a través del polímero y se separan de acuerdo con su tamaño. Cuando éstos llegan a la ventana del capilar son iluminados por un haz de luz láser, el marcador fluorescente unido al fragmento de ADN se excita y emite una longitud de onda específica para cada marcador fluorescente. La luz es colectada y separada por un espectrógrafo en función de la longitud de onda. Al final de la corrida la computadora analiza automáticamente los datos colectados y los muestra en forma de electroferogramas en donde se incluye la secuencia de nucleótidos del fragmento, la cual posee una precisión del 98.5% en 425 bases, dependiendo de la concentración y la limpieza de la muestra. Dado que los fragmentos de ADN pertenecientes al gen *e1* obtenidos por PCR, tenían un peso molecular de aproximadamente 2000 pares de bases, fue necesario llevar

a cabo 6 reacciones de PCR de secuencia en cada uno de los sentidos, para verificar las secuencias obtenidas en ambas direcciones.

El análisis de los datos se realizó con los paquete DNASIS y BLAST vía Internet. Las posiciones de los nucleótidos se numeraron de acuerdo con la base de datos de secuencias de 1997 (Los Alamos National Laboratory, NM) contra la cual se comparó, considerándose ésta como la referencia para los diferentes tipos de VPH. Se identificaron los cambios de las variantes y se ubicaron dentro de los dominios del gen *e1*.

RESULTADOS

Amplificación del gen e1 por la técnica de PCR.

Las muestras de ADN provenientes de cuatro tumores fueron amplificadas utilizando los oligonucleótidos externos a la secuencia de interés. Ello permitió obtener numerosas copias del gen *e1* de las variantes AA-a y AA-c del VPH16. El tamaño esperado de los fragmentos era de 2034 bases, del nucleótido 811 al 2844.

En todas las muestras de ADN tumoral y en los controles positivos se amplificó un fragmento que migró de acuerdo con las dimensiones aproximadas de 2000 pb, y no se observó amplificación en las muestras de sangre humana.

En la figura 3 se presenta uno de los fragmentos originado por la amplificación del ADN de la variante AA-c; como control positivo para la amplificación se empleó un plásmido conteniendo el genoma del VPH16 proveniente de la variante Europea. Tanto el fragmento generado por la amplificación del ADN control, como el amplificado a partir del tumor, migraron la misma distancia, ubicada entre las bandas del marcador de pesos moleculares 1 Kb plus que corresponden a 3000 y 2000 pares de bases. Cabe recordar que el gen *e1* del VPH16, tiene una longitud de 1950 bases.

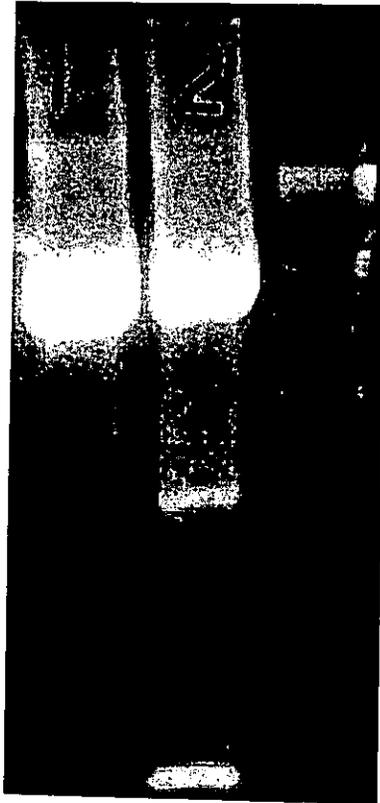


Figura 3. Productos de la amplificación por PCR. En el carril 1 el control positivo, carril 2, fragmentos obtenidos a partir del ADN de la variante AA-c y carril 3, marcador de pesos moleculares 1Kb plus.

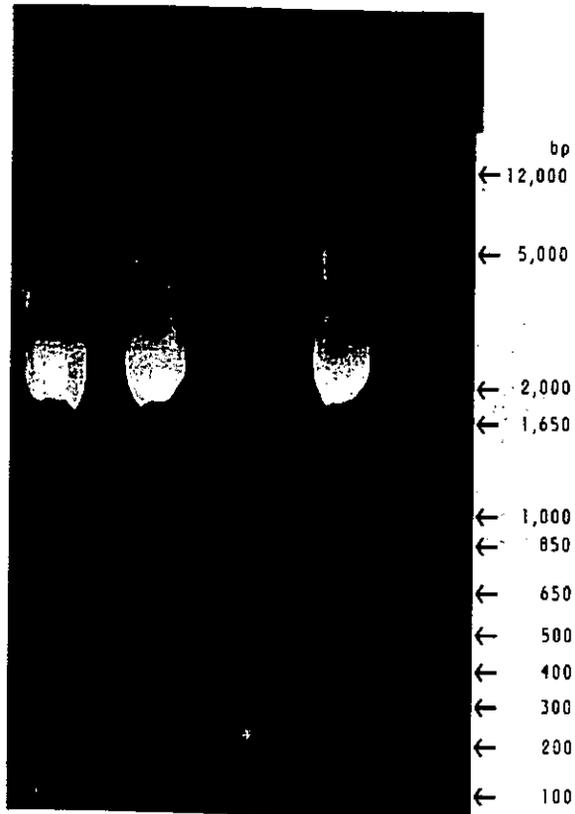


Figura 4. Fragmentos amplificados a partir del ADN de la variante AA-c y purificados por QiaexII. Carril 1, 2 μ l de la segunda elusión; carril 2, 2 μ l de la primera elusión; carril 3, marcador de pesos moleculares y carril 4, 2 μ l de la muestra sin purificar.

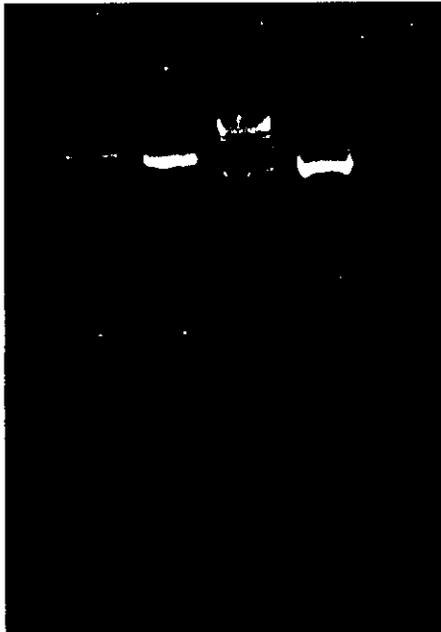


Figura 5. Productos de la amplificación por PCR. En el carril 1, fragmento obtenido a partir del ADN de la variante AA-c; carril 2, fragmento obtenido a partir de AA-a; carril 3, control negativo; carril 4 control positivo y carril 5, marcador de pesos moleculares.

La recuperación de los fragmentos amplificados, purificados con el paquete Qiaex, fue superior al 80%. En la figura 4, se presenta uno de los fragmentos purificado, proveniente del gen *e1* de la variante AA-c. En los carriles uno y dos se muestra la primera y segunda elusiones. Se puede observar que la banda purificada migra paralela al marcador de 2000 pb. En la figura 5 se muestran dos fragmentos amplificados, uno a partir del ADN de la variante AA-c y otro a partir del ADN de la variante AA-a.

Determinación de la secuencia del gen de E1.

Una vez purificados los fragmentos de interés, se procedió a determinar y analizar sus secuencias. En la figura 6 se muestra una comparación de los electroferogramas de dos fragmentos de las secuencias obtenidas de las variantes AA-a y AA-c; las diferencias observadas se indican con flechas.

En total se identificaron 29 cambios nucleotídicos, de ellos 28 correspondieron a la variante AA-a y 27 a la variante AA-c, lo que equivale al 1.45% de los 1950 nucleótidos secuenciados en ambos casos. En la tabla III se resumen los cambios de los genes variantes y los sitios de restricción que se eliminaron o que se crearon como resultado de esos cambios. Sin embargo, no se corroboró experimentalmente el nuevo patrón de restricción esperado.

De los 29 cambios nucleotídicos encontrados, 11 fueron comunes para ambas variantes y se traducen en sustituciones de los aminoácidos codificados, lo que

Tabla III. . Cambios en la secuencia entre las variantes AA-a y AA-c en relación a la variante E de referencia, modificaciones esperadas en los aminoácidos codificados, así como, los sitios de restricción que se generan o se pierden en las variantes AA para el gen *e1* del VPH16.

RESUMEN DE CAMBIOS EN LAS VARIANTES Y SU LOCALIZACION

Nucleótido	2650	596	
Referencia	2631	589	Clal+ 1742 TaqI+ 1743
Variantes	2608	582	AtuII+ 1721 BstNI+ 1721
Aminoácido	2586	574	
	2376	504	ApyI+ 1721
	2344	494	
	2343	493	
	2287	475	
	2262	466	
	2254	464	AccI+ 1397
	2249	462	
	2237	458	EcoRI+ 1385 AccI+ 1351
	2220	452	
	2041	393	
	1842	326	DraI+ 1176
	1744	294	
	1668	268	
	1624	254	Nsp 802
	1522	220	
	1486	208	
	1426	188	
	1377	171	
	1366	168	RsaI- 510 AluI- 333
	1200	112	
	1163	100	
	1096	78	FokI- 298
	1041	59	BglII+ 138 DpnI+ 139*
	1006	48	
	921	19	Sau3AI+ 139
Referencia	T T A C G T T C C A T G C A C G T C G A C T C C T C C T A T G	F L L Q G A C Y Q L S L A L I L E T R L G L F L S S R P E K	
Variantes	C T G G A C A T G C A T G A G T C G A C T C C A A		
Aminoácido	T C G G A C A T G A G T C G A C T C C C A A		
Referencia			
Variantes			
Sitios de restricción			

*Sólo en AAC

Figura 6. Electroferogramas de secuencia provenientes de las variantes AA-a y AA-c; las diferencias en las secuencias se marcan con flechas.

C → 150
 T T G T C A A A T G G A A C I C A T T I G G A A A T G T A A A C A C C A C C A A T C G A I T A T G I A A A T A A A G C C A C C T T G A A T C I G I A 260
 A → 190
 T → 230
 A → 250

T T T G T C A A A T G G A A A C T C A T T T G G A A A T G T A A A C A C C A C C A A T C G A T T A T G T A A A T A A G G C C A C C T T G G A A T C T G T A C 260
 A → 190
 T → 230
 A → 250

A A T G T T T T A T A C T G T C A G C T A T A C T G G G T G T A A G T C C A A A T G C A G C A A T A C A C C A A T C G C A A C A C G I T G A T T T A 260
 A → 190
 T → 230
 A → 250

A A T G T T T T A T A C T G T C A G C T A T A C T G G G T G T A A G T C C A A A T G C A G C A A T A C A C C A A T C G C A A C A C G T T G A T T T A 260
 A → 190
 T → 230
 A → 250

A A T G T T T T A T A C T G T C A G C T A T A C T G G G T G T A A G T C C A A A T G C A G C A A T A C A C C A A T C G C A A C A C G T T G A T T T A 260
 A → 190
 T → 230
 A → 250

corresponde al 1.9 % de los 650 aminoácidos que constituyen a la proteína. En la tabla III se presentan estos cambios.

Cinco de estas sustituciones (Q78E, G100E, C168S, Q188E y S220T) se localizaron en la región amino terminal (amino ácidos 1-237) y las seis restantes (L294M, I326M, E452D, T458S, R462K y E596K) en la parte media de la molécula (amino ácidos 238-605); no se detectó sustitución alguna en el extremo carboxilo terminal (amino ácidos 606-649).

En el diagrama de la figura 7, se muestra la ubicación de las sustituciones de amino ácidos sobre la proteína y se señalan los dominios funcionales involucrados, ya sean putativos o identificados. Los dominios funcionales putativos, son regiones de la proteína en las que se ha identificado de forma delimitada cierta actividad en otros tipos virales, y los hemos ubicado en las regiones homólogas del VPH16.

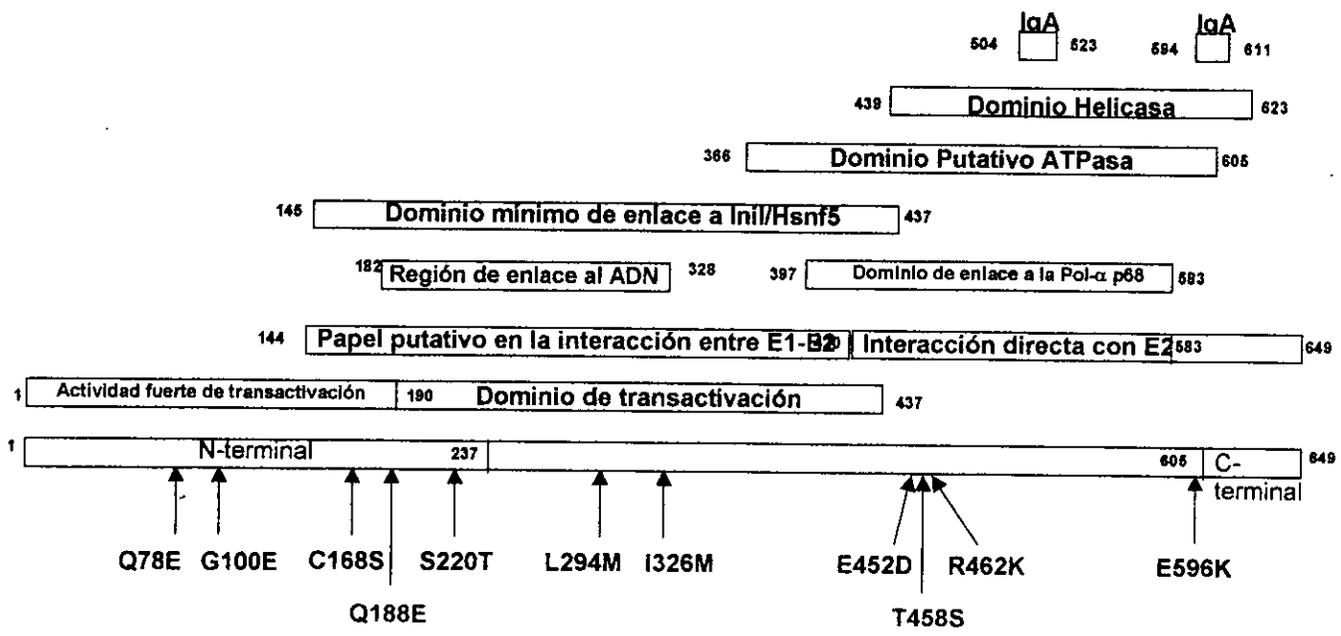
Se encontraron siete mutaciones no silenciosas en el dominio de transactivación (amino ácidos 1-437). Cuatro de ellas, específicamente: Q78E, G100E, C168S y Q188E, se localizaron dentro de un sitio de transactivación fuerte (amino ácidos 1-190; Yasugi, et al, 1997a y 1997b).

Nueve sustituciones: C168S, Q188E, S220T, L294M, I326M, E452D, T458S, R462K y E596K, se localizaron dentro del conjunto de residuos necesarios para la formación de complejos eficientes con E2 (residuos 144-649; Yasugi, et al, 1997a y 1997b) y el primero se ubicó en la pequeña región homóloga (residuos

87-186) necesaria para dirigir la localización nuclear de las proteínas de fusión (región de homología entre PVB1 E1 y el antígeno T de SV40; Xiao, 1994); cinco de estas nueve substituciones C168S, Q188E, S220T, L294M y I326M se ubicaron en dos sitios putativos: la región involucrada en la interacción entre E1E2 (amino ácidos 144-420; Yasugi, et al, 1997a y 1997b) y el dominio de unión mínimo entre IniI/hSnf5 (amino ácidos 147-444; Lee et al. , 1999). Cuatro substituciones, Q188E, S220T, L294M y I326M, también se localizaron superpuestas en la región de unión al ADN (residuos 182-328; Leng, 1997), al menos las últimas tres substituciones T458S, R462K y E596K se localizaron en un dominio compartido (Masterson, et al, 1998; Zou, et al, 1998) por la actividad de helicasa (amino ácidos 439 al 623), la actividad ATPasa (sitio putativo amino ácidos del 366 al 605), los dominios de unión entre p68 y la polimerasa α -Primasa (amino ácidos del 397 al 583) además del fragmento más pequeño capaz de unirse con E2 (amino ácidos del 421 al 649). Justo la última mutación afectó una de las regiones capaces de generar respuestas de tipo IgA (Dillner, 1990) con péptidos sintéticos derivados de E1, los cuales comprenden las regiones de amino ácidos 504 al 523 y 594 al 611.

Figura 7. Localización de sustituciones de aminoácidos en los dominios identificados.

37



ANÁLISIS DE RESULTADOS

La interacción entre las proteínas E1-E2 es importante para la replicación del ADN del VPH16 (Kasukawa et al., 1998). Se ha corroborado que la presencia de E2 es necesaria para que E1 se una de manera específica al origen de replicación. Ello apunta a que el reconocimiento inicial del *ori* puede estar determinado por E2 (Masterson et al., 1998). Esta interacción es específica ya que las quimeras de E1-E2 de distintos tipos de VPH presentan diferentes actividades relativas de replicación en ensayos de interacciones funcionales (Zou et al., 1998).

El gen *e1* consta de 1950 nucleótidos que codifican 650 amino ácidos. En el fragmento peptídico más pequeño capaz de unirse a la proteína E2, que comprende los amino ácidos del 421 al 649 (Masterson et al., 1998), detectamos 13 cambios de nucleótidos. Cuatro de ellos se traducen en sustituciones no sinónimas (E452D, T458S, R462K y E596K) y nueve no cambiaron el amino ácido codificado. A un lado de la región de E1 requerida para el enlace con E2 a temperaturas fisiológicas (amino ácidos 144-649, 20°C y 37°C, Yasugi et al, 1997a) Se ubicaron 10 mutaciones más, cinco de las cuales corresponden a sustituciones no sinónimas (C168S, Q188E, S220T, L294M y I326M) y cinco no cambiaron el aminoácido codificado.

De acuerdo con Lee, et al. (1999), las proteínas E1 y E2 del VPH18 y el factor celular Ini1/hSnf5 forman un complejo ternario *in vitro* que es importante para la replicación del ADN viral. Ini1/hSnf5 es un componente del complejo multiprotéico SWI/SNF. Los datos genéticos estructurales sugieren que el complejo es esencial para la activación transcripcional de varias funciones génicas inducibles, ya que desestabiliza la estructura de la cromatina en el nivel de promotores y facilita el acceso de la maquinaria de transcripción celular.

Las proteínas SWI/SNF median la interacción entre los activadores transcripcionales específicos de cada gen y los factores de transcripción comunes, facilitando el acceso de la maquinaria transcripcional (Kalpana, 1994).

Las variantes AA del VPH16 mostraron 10 cambios nucleotídicos, 5 de estos generan sustituciones no sinónimas (C168S, Q188E, S220T, L294M y I326M) a lo largo del sitio putativo de enlace de IniI/Hsnf5 (putativo, porque se dedujo de la alineación de las secuencias de *e1* de los VPH18 y VPH16), entre los amino ácidos 147 y 444. Se identificaron además, tres mutaciones no sinónimas en la región de interacción con E2 (amino ácidos del 421 al 583) y una más en el fragmento más pequeño (amino ácidos del 584 al 649) capaz de unirse a E2 (Masterson et al. , 1998). En un trabajo previo (Casas et al, 1999),

se identificó una sustitución no sinónima, que se ubica en el aminoácido 35 de E2, dentro de la región de interacción entre E2 y E1.

Si el VPH16 forma un complejo ternario similar al que forma el VPH18, es posible que los cambios en el gen *e1* tuviesen un efecto favorable sobre las interacciones entre los miembros del complejo ternario, manteniendo o incrementando la eficiencia de la replicación, ya que como se indicó en la introducción, las variantes del VPH16 se encuentran en gran número de copias en los carcinomas cervicales (Casas et al, 1999).

En una etapa posterior del proceso de replicación, el reclutamiento de la pol α -primasa sobre el *ori* es crítico, dado que es la única polimerasa capaz de iniciar cadenas nuevas de ADN. La región carboxilo terminal de E1 del VPH16 (aminoácidos 397-583) al parecer es esencial para la interacción de esta proteína con la subunidad p68 de la pol α -primasa.

En la región de interacción con p68 las variantes AA-a y AA-c mostraron siete y ocho mutaciones silenciosas respectivamente, más tres sustituciones comunes no sinónimas (E452D, T458S y R462K).

Aunque no hay evidencia suficiente para establecer un papel directo de E1 en la regulación de la transcripción, Yasugi et al en 1997 identificaron una fuerte actividad de transactivación del extremo amino (aminoácidos del 1 al 90) sobre el promotor constitutivo de la levadura ADC1. En este trabajo encontramos 9 cambios de nucleótidos en esta región y cuatro de ellas se traducen como

sustituciones no sinónimas (Q78E, G100E, C168S y Q188E) en ambas variantes. Además hay un par de cambios ubicados en dos regiones generadoras de respuesta IgA (amino ácidos del 504-523 y del 594-611) (Dillner, 1990) una mutación silenciosa y una no-sinónima (nucleótido G2650A y aminoácido E596K) en la región menos reactiva.

Hasta la fecha el grupo del Dr. Berumen ha secuenciado alrededor de 5000 nucleótidos (incluyendo los genes *e1*, *e2*, *e6*, *e7* y las regiones LI/MY y LCR) de ambas variantes AA-a y AA-c y cada una exhibe 82 cambios en nucleótidos y 35 sustituciones de amino ácidos. Lo que sugiere que el comportamiento diferente de estas variantes podría explicarse por algunas de las mutaciones.

CONCLUSIONES

En este trabajo caracterizamos el gen *e1* de dos variantes del VPH16, denominadas AA-a y AA-c. Aunque existe un cambio nucleotídico, respecto de la referencia, específico del gen *e1* para la variante AA-a y dos específicos para el gen *e1* de la variante AA-c, ambas proteínas poseen las mismas sustituciones teóricas de amino ácidos.

Se ha propuesto que la integración del genoma viral con la pérdida de una región entre los genes *e1* y *e2* es un mecanismo que permite la expresión de los oncogenes (debida a la pérdida de la represión transcripcional ejercida por la proteína E2). Sin embargo, el VPH16, también se ha encontrado en forma episomal, o bien en una combinación de ambas formas.

En los tumores analizados, el gen *e1* estaba íntegro, lo que aunado a las diferencias encontradas en las secuencias podría ser una indicación de la agresividad específica de estas variantes en la etiología del cáncer cervico uterino en México. Si los cambios en la proteína E2 variante afectaran su actividad represora de la transcripción de los oncogenes, la presencia de E2 no afectaría el desarrollo del cáncer. Además, si los cambios de la proteína E1 variante coadyuvaran, junto con la presencia de la proteína E2 variante, a una replicación más eficiente, se explicaría

el gran número de copias en que se presentan estos virus variantes. Sin embargo, para poder avanzar en esta perspectiva, resultan indispensables los estudios funcionales de las variantes.

BIBLIOGRAFÍA

Berg M, Stenlund A., Functional interactions between papillomavirus E1 and E2 proteins, *J Virol.*71:3853-63, 1997.

Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman N, Hansen AN, Peto J., Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective, *J Natl Cancer Inst.* 87:796-802, 1995.

Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, Lopez N, Guido M, Berumen J., Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas, *Int J Cancer.* 83:449-55, 1999.

Chan SY, Bernard HU, Ong CK, Chan SP, Hofmann B, Delius H., Phylogenetic analysis of 48 papillomavirus types and 28 subtypes and variants: a showcase for the molecular evolution of DNA viruses, *J Virol.* 66:5714-25, 1992.

Chiang CM, Dong G, Broker TR, Chow LT., Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins, *J Virol.* 66:5224-5231, 1992.

Di Luca, D., Pilotti, S., Stefanon, B., Rotola, A., Monini, P., Tognon, M., De Palo, G., Rilke, F., and Cassai, E., Human papillomavirus type 16 DNA in genital tumors: A pathological and molecular analysis, *J. Gen Virol.* 67:583-589, 1986.

Dillner J., Mapping of linear epitopes of human papillomavirus type 16: the E1, E2, E4, E5, E6 and E7 open reading frames, *Int J Cancer.* 46:703-11, 1990.

DiPaolo JD, Popescu N, Alvarez L, Woodworth C., Cellular and molecular alterations in human epithelial cells transformed by recombinant human papillomavirus DNA. *Crit Rev Oncog.* 4:337-360, 1993.

Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS., The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer, *Nat Med.* 1:464-70, 1995.

Escandón-Romero C, Benítez-Martínez OG, Navarrete-Espinoza J, Vázquez-

- Martínez JL, Martínez-Montañez OG, Escobedo-De la Peña J., *Epidemiología del Cáncer Cérvico-Uterino en el Instituto Mexicano del Seguro Social, Salud Pública de México.* 34:607-614, 1992.
- Faras JA, Kryzek AR, Ostrow SR, Watts LS, Smith, MD and Pass F., *Genetic variations among papillomaviruses, Annals New York of sciences.* 60-77, 1980.
- Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Sattler CA, Lambert PF., *Establishment of the human papillomavirus type 16 (HPV-16) life cycle in an immortalized human foreskin keratinocyte cell line, Virology.* 262:344-54, 1999.
- Flores ER, Lambert PF., *Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle, J Virol.* 71:7167-79, 1997.
- Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, Yamakawa Y, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K., *Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in preinvasive and invasive cervical neoplasias, Virus Genes.* 9:85-92 1994.
- Hernández-Ávila M, Lazcano-Ponce EC, Berumen-Campos J, Cruz-Valdez A, Alonso de Ruiz PP, González-Lira G., *Human papillomavirus 16-18 infection and cervical cancer in México: a case-control study. Arch Med Res.* 28: 265-71, 1997.
- Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nasos P, Labropoulou V, Mitrani-Rosenbaun S, Pillai MR, Stoerker J, Syrjänen S, Tay SK, Villa LL, Wheeler CM, Williamson AL, Bernard HU., *The genetic drift of the human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations, J Virol.* 67:6413-6423, 1993.
- Ho L, Chan SY, Chow V, Chong TS, Tay SK, Villa LL, Bernard HU., *Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree, J Clin Microbiol.* 29: 1765-1772, 1991.
- Howley PM., *Role of the human papillomaviruses in human cancer. Cancer Res.* 51(18 Suppl):5019s-5022s, 1991.
- Icenogle JP, Sathya P, Miller DL, Tucker RA, Rawls WE., *Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16, Virology.* 184:101-7, 1991.

Kalpana GV, Marmon S, Wang W, Crabtree GR, Goff SP., Binding and stimulation of HIV-1 integrase by a human homologue of yeast transcription factor SNF5, *Science*. 266:2002-6, 1994.

Kasukawa H, Howley PM, Benson JD., A fifteen-amino-acid peptide inhibits human papillomavirus E1-E2 interaction and human papillomavirus DNA replication in vitro, *J Virol*. 72:8166-73, 1998.

Kuo SR, Liu JS, Broker TR, Chow LT., Cell-free replication of the human papillomavirus ADN with homologous viral E1 and E2 proteins and human cell extracts, *J Biol Chem*. 269:24058-65, 1994.

Lazcano E., Nájera P., Buiatti E. y Hernandez-Avila M., Programa de detección oportuna del cáncer cervical en México. I Diagnóstico situacional. *Rev. Inst. Nal. Cancerología* 42: 123-140, 1996.

Lee D, Sohn H, Kalpana GV, Choe J., Interaction of E1 and hSNF5 proteins stimulates replication of human papillomavirus DNA., *Nature*; 399:487-91, 1999.

Leng X, Ludes-Meyers JH, Wilson VG., Isolation of an amino-terminal region of bovine papillomavirus type 1 E1 protein that retains origin binding and E2 interaction capacity, *J Virol*. 71:848-52, 1997.

Liu JS, Kuo SR, Broker TR, Chow LT., The functions of human papillomavirus type 11 E1, E2, and E2C proteins in cell-free DNA replication, *J Biol Chem*. 270:27283-91, 1995.

Lizano M, Berumen J, Guido MC, Casas L, García-Carrancá A., Association between human papillomavirus type 18 variants and histopathology of cervical cancer, *J Natl Cancer Inst*. 89:1-4, 1997.

Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick J, Wheeler C, Singer A., Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities, *Int J Cancer*. 69:364-368, 1996.

Masterson PJ, Stanley MA, Lewis AP, Romanos MA., A C-terminal helicase domain of the human papillomavirus E1 protein binds E2 and the DNA polymerase alpha-primase p68 subunit, *J Virol*. 72:7407-19, 1998.

Morrison EA., Natural history of cervical infection with human

- papillomaviruses, *Clin Infect Dis.* 18:172-80, 1994.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Shah KV., The role of HPV in the etiology of cervical cancer, *Mutat Res.* 305:293-301, 1994.
- Pfister H, Gissmann L, and Zur Hausen H., Partial characterization of the proteins of the human papillomaviruses (VPH) 1-3, *Virology.* 83:131-137, 1977.
- Stoppler MC, Ching K, Stoppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J., Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation, *J Virol.* 70:6987-93, 1996.
- Sverdrup F and Myers G., The E1 Protein, Human Papillomaviruses: A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences, The human papillomavirus compendium, Los Alamos National Laboratory, 1997.
- ter Meulen J, Schweigler AC, Eberhardt HC, Luande J, Mgaya HN, Muller M, Bleul C, Ulken V, Ikenberg H, Pawlita M., Sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 18 in tumor and non-tumor patients and antibody response to a conserved seroreactive epitope, *Int J Cancer.* 53:257-9, 1993.
- Ustav M, Stenlund A., Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames, *EMBO J.* 10:449-57, 1991.
- Ustav M, Ustav E, Szymanski P, Stenlund A., Identification of the origin of replication of bovine papillomavirus and characterization of the viral origin recognition factor E1, *EMBO J.* 10:4321-9, 1991.
- Van Ranst MA, Tachezy R., Dellius H, Burk RD., Taxonomy of the human papillomaviruses, *Papillomavirus Rep.* 4:61-65, 1993.
- Vizcaino, PA, Moreno, V, Bosch, XF, Muñoz, N, Barros-Dios, XM, Parkin, MD., International trends in the incidence of cervical cancer: I. Adenocarcinoma and Adenosquamous cell carcinomas, *Int J Cancer* 75:536-545, 1998.
- Wheeler C, and Icenogle J., A closer look at papillomavirus variants, The

- human papillomavirus compendium, Los Alamos National Laboratory, 1995.
- Wieland U, Pfister H, Molecular diagnosis of persistent human papillomavirus infections, *Intervirol.* 39:145-57, 1996.
- Williamson AL, Brink NS, Dehaeck CMC, Ovens S, Soeters R, Rybicki EP., Typing of human papilloma virus in cervical carcinoma biopsies from Cap Town, *J Med Virol.* 43:231-237, 1994.
- Xi LF, Demers WG, Koutsky LA, Kiviat NB, Kuypers J, Watts HD, Holmes KK, and Galloway DA., Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection, *Journal of Infectious Diseases.* 172:747-55, 1995.
- Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, Kuypers J, Hughes JP, Wheeler CM, Holmes KK, Kiviat NB, Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia, *J Natl Cancer Inst.* 89:796-802, 1997.
- Xiao H, Pearson A, Coulombe B, Truant R, Zhang S, Regier JL, Triezenberg SJ, Reinberg D, Flores O, Ingles CJ., Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53, *Mol Cell Biol.* 14:7013-24, 1994.
- Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, Wheeler CM., Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective, *J Virol.* 71:2463-72, 1997.
- Yamada T, Wheeler CM, Halpern AL, Stewart AC, Hildesheim A, Jenison SA., Human papillomavirus type 16 variant lineages in United States populations characterized by nucleotide sequence analysis of the E6, L2, and L1 coding segments, *J Virol.* 69:7743-53, 1995.
- Yang L, Li R, Mohr IJ, Clark R, Botchan MR., Activation of BPV-1 replication in vitro by the transcription factor E2, *Nature.* 353:628-32, 1991.
- Yang Y, Shen J, Tate JE, Wang K, Su T, Wang K, Jeng C, Chen H, Chiang S and Crum, C., 1997, Cervical cancer in young human in Taiwan: Prognosis is independent of papillomavirus or tumor cell type, *Gynecologic Oncology,* 64:59-63.
- Yasugi T, Benson JD, Sakai H, Vidal M, Howley PM., Mapping and characterization of the interaction domains of human papillomavirus type

16 E1 and E2 proteins, *Virology*. 71:891-9, 1997a.

Yasugi T, Vidal M, Sakai H, Howley PM, Benson JD., Two classes of human papillomavirus type 16 E1 mutants suggest pleiotropic conformational constraints affecting E1 multimerization, E2 interaction, and interaction with cellular proteins, *J Virol*. 71:5942-51, 1997b.

Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M., Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype, *Cancer Res*. 58:829-833, 1998.

Zou N, Liu JS, Kuo SR, Broker TR, Chow LT., The carboxyl-terminal region of the human papillomavirus type 16 E1 protein determines E2 protein specificity during DNA replication, *J Virol*. 72:3436-41, 1998.

zur Hausen H., Viruses in human cancers, *Science*. 254:1167-73, 1991.

zur Hausen H., Papillomaviruses in anogenital cancer as a model to understand the role of viruses in human cancers, *Cancer Res*. 49:4677-4681, 1989.

zur Hausen H., Papillomavirus infections a major cause of human cancers, *Biochim Biophys Acta*. 1288:F55-78, 1996.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**