

01421
198



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIAGNÓSTICO MOLECULAR
DE VPH EN
PATOLOGÍA BUCAL

T E S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
CIRUJANO DENTISTA
P R E S E N T A

ISABEL MARTÍNEZ SANABRIA

DIRECTORA: MTRA. BEATRIZ C. ALDAPE BARRIOS

Ve Bo
Martínez



MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2003

A



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.

CON
ORIGEN



B

RESPECTO

Miza Beatriz C. Aldape Barrios

Jefa del Departamento de Patología Bucal y Estomatológica

División de Estudios de Posgrado e Investigación

UNAM

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

UN SINCERO AGRADECIMIENTO A:

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DR. MAURICIO SALCEDO
Unidad de Investigación Médica CMN SXXI-IMSS

DR. ALEJANDRO GARCÍA CARRANCA
Instituto Nacional de Cancerología- UNAM

Q.F.B CARLOS MONTOYA JUÁREZ
Centro Médico Nacional SXXI- IMSS

LIC. ALEJANDRO OLVERA ORDOÑEZ
Ejecutivo de Ventas Biología Molecular
División Diagnósticos

Dr. LEONARDO VILLALVAZO CORDERO
Anatomo Patólogo, Citopatología

**POR SU A
COLABORACIÓN**

A DIOS.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

*A MIS ADORADOS
PADRES*

*Gracias por el infinito amor que siempre me
han profesado y por su apoyo invaluable.*

A MIS HERMANOS;

Por el cariño y comprensión que me han brindado siempre.

11

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A MARIO ;

*Gracias por tu ayuda incondicional y
por el profundo amor que me tienes.*

TE AMO

Por sus

RELATOS EN EL

Por su ejemplo y su eterna memoria hacia mí.

A MI FAMILIA

A MIS SOBRINOS

A MIS GRANDES AMIGOS;

Maripaz, Paty, Lourdes,

Gaby, Susana, Janett, Seydy

Alberto,

Fernando,

Jorge, Gustavo.

TRIS CON
FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES.....	6
BASES MOLECULARES FUNDAMENTALES.....	9
1.1 Ácidos nucleicos.....	9
1.2 ADN.....	12
LOS VIRUS.....	14
2.1 Estructura.....	14
2.2 Clasificación.....	16
2.3 Interacción virus- célula.....	16
-Fijación.....	16
-Replicación.....	17
-Transcripción.....	18
2.4. Patogenia.....	19
2.5. Virus ADN.....	21
2.6. Virus oncogénicos.....	22
VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.....	24
3.1 Estructura.....	25
3.2 Réplicación.....	28
3.3 Clasificación.....	28
3.4 Patogenia.....	30
3.5 Tipos de VPH encontrados en mucosa bucal.....	33
3.6 Transformación celular maligna.....	33
VPH Y SU GENOMA.....	35
PROCEDIMIENTOS DE IDENTIFICACIÓN VIRAL.....	38
5.1 Microscopía electrónica.....	38
5.2 Fraccionamiento celular.....	38
5.3 Digestión con enzimas de restricción.....	40

5.4 Reacción de cadena de polimerasa (PCR).....	40
5.5 Análisis de ácidos nucleicos.....	46
- Southern Blott.....	47
- Hibridación <i>in situ</i>	50
- Hibridación <i>in situ</i> por fluorescencia.....	53
- Captura de Híbridos.....	54
5.3 Detección material genómico viral.....	57
5.4 Identificación molecular de VPH.....	58
DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN PATOLOGÍA BUCAL.....	62
6.1 Diagnóstico de VPH en mucosa bucal.....	62
CONCLUSIONES.....	67
REFERENCIAS.....	68
GLOSARIO.....	70

ÍNDICE DE FIGURAS

FIG. 1 Nucléotidos	FIG. 11 Expresión génica VPH	FIG. 21 FISH
FIG. 2 Estructura del ADN	FIG. 12 Clasificación VPH	FIG. 22 Captura
FIG. 3 Bases nitrogenadas	FIG. 13 Variantes VPH	Híbridos
FIG. 4 Estructuras virales	FIG. 14 VPH mucosa bucal	FIG. 23 Captura de
FIG. 5 Ciclo viral	FIG. 15 Efecto mutagénico del VPH en la célula	Híbridos
FIG. 6 Replicación viral	FIG. 16 Interacción E6 y E7 en la célula	FIG. 24 VPH (PCR)
FIG. 7 Transcripción viral	FIG. 17 PCR	FIG. 25 VPH (PCR)
FIG. 8 Virus de ADN	FIG. 18 VPH 16 (PCR)	
FIG. 9 Genes estructurales del VPH	FIG. 19 Southern blott	
FIG. 10 Genoma del VPH	FIG. 20 Southern blott	

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

4

INTRODUCCIÓN

Las modernas técnicas de biología molecular han demostrado la participación de los VPH en la patogénesis del cáncer en las diferentes localizaciones del cuerpo humano, incluyendo neoplasias de mucosa bucal, cabeza y cuello. El epiteliotropismo viral permite el desarrollo y proliferación del virión en cualquier epitelio. El diagnóstico directo del ADN de HPV ha cobrado importancia dado que el virus no necesariamente debe estar intacto para inducir la enfermedad, además puede permanecer como infección latente en la célula hospedera y manifestarse tardíamente.

Los resultados obtenidos han determinado la identificación de los mecanismos moleculares que lo presentan como el virus de mayor potencial oncogénico. Cada tipo específico viral tiene su propio comportamiento molecular y de interacción celular por lo que en todos los casos se vuelve de importancia fundamental la identificación del genotipo. La detección de secuencias genómicas de HPV se basa especialmente en la amplificación de secuencias virales blanco por PCR o en la hibridización (y las técnicas derivadas de éstos) las limitaciones de éstos métodos están dadas por su sensibilidad, utilidad clínica, complejidad, fiabilidad, facilidad de ejecución y disponibilidad comercial.

Las metodologías utilizadas son diferentes y cada una de ellas posee su significativo impacto desde el punto de vista de sensibilidad y/o especificidad. En los últimos años se han unificado criterios metodológicos para su diagnóstico y fundamentalmente para su tipificación. Recientemente se ha desarrollado un sistema diagnóstico que identifica la presencia de ADN del virus denominado Captura Híbrida de segunda generación, éste es el único sistema disponible que, sin amplificación previa del ADN viral, es capaz de diagnosticar la infección con pequeñas cantidades de muestra biológica. Aplicable por su sencillez y eficacia a la identificación del virus papiloma humano en mucosa bucal.

ANTECEDENTES

En 1925, Buschke A y Loweistein D. describieron un tumor peculiar del área genital, verrucoso, bien diferenciado con características de condiloma acuminado, ésta lesión finalmente se transformaba en tumor maligno⁷.

En 1933 Shope R. aisló el primer virus papiloma de lesiones papilomatosas en piel de conejos, estudió también el cáncer de esófago en bovinos en donde se ha identificado al papiloma virus bovino tipo 4. Éstos virus son epiteliotrópicos y su genoma mide aproximadamente 8 kilobases de longitud con un peso molecular de 5×10^6 daltons.^{7, 13}

Presentan una cápside icosaédrica compuesta de 72 capsómeros con un diámetro de 52-55 nm rodeado el genoma de DNA y conformado por dos proteínas mayores de la cápside : L1 y L2.^{1, 7, 13}

El VPH exhibe un alto grado de tropismo por el epitelio escamoso en diferentes regiones corporales. Es posible que las diferencias en la distribución de los receptores para el VPH en dichas células sea un factor importante para la presencia restringida de tipos específicos de VPH, sin embargo los elementos más importantes que determinan la especificidad de los virus son los factores de transcripción producidos por las células hospederas. La expresión de los genes de los diferentes tipos de VPH la regulan de manera estricta y específica factores de transcripción, como AP-1, el factor específico de queratinocitos, NF-1/CTF, CEF1, CEFII y TEF1 y algunos factores de origen hormonal²

La naturaleza de las verrugas humanas se conoce desde 1907 cuando Ciuffo G. estableció la etiología viral de estas lesiones, pero sólo desde hace poco tiempo con el advenimiento de la virología molecular, el virus causal está siendo estudiado.¹

Actualmente los métodos proporcionados por la Biología Molecular y la Tecnología de Recombinación demuestran ser útiles en la detección de material genético de los virus relacionados con el cáncer como el virus del papiloma humano³

Hasta fines de la década de los años 60, se creía que todas las lesiones verrugosas de piel y mucosas, ya sea condilomatosas o planas juveniles, eran causadas por un sólo tipo de HPV y que las diferencias en su aspecto clínico morfológico se debían a su localización. Las técnicas de hibridación molecular han permitido caracterizar el DNA de diferentes tipos de HPV, en base al estudio de su organización genética y secuencias nucleotídicas e identificarlos en muestras clínicas, independientemente de la diferenciación celular o del grado de severidad de la lesión³

Spielgman inventó la técnica de hibridación de ácidos nucleicos sobre filtros de nitrocelulosa. En 1975 Southern E. diseña una técnica pilar de la ingeniería genética; las endonucleasas de restricción y las sondas o rastreadores moleculares. La técnica llamada Southern blot de transferencia de ADN desde los geles donde se ha hecho la electroforesis a un filtro de nitrocelulosa, lleva el apellido de su inventor, además de significar en inglés, "hacia el sur" . En broma se bautizó a la técnica para transferir ARN Northern blot y a la que transfiere proteínas Western blot . La palabra blot podría traducirse como secante, pues el filtro de nitrocelulosa absorbe el ADN del gel como un papel secante.⁶

Se ha demostrado el valor de la detección del DNA del HPV de alto riesgo "DNA HPV testing" como método complementario de diagnóstico molecular⁴

La diferencia entre las técnicas de hibridación que se utilizan actualmente radican en las características de las muestras a estudiar (células o tejidos, frescos o fijados, parafinados o congelados), necesidad de extracción del DNA, información que brindan, sensibilidad y especificidad.³

La Hibridación in situ de fluorescencia (FISH) es más rápida que el Dot - Blot ya que no se realiza la extracción de DNA. Es poco específica, pero es útil para estudiar con gran número de muestras. La hibridación "*in situ*" es una técnica relativamente rápida y accesible a los laboratorios de diagnóstico; en este caso, se obtiene una coloración específica en los núcleos positivos, fácilmente observable en un microscopio óptico de rutina.⁶

La experiencia del laboratorio es fundamental para obtener resultados fiables (sobre todo en el caso de las técnicas de PCR). Los métodos clásicos de diagnóstico vírico, como la microscopía electrónica, los cultivos celulares y ciertos métodos inmunológicos, no son adecuados para la detección del VPH. Este virus no puede cultivarse en cultivos celulares. El método establecido para la detección vírica sistemática es la hibridación de ácidos nucleicos.⁶

- Ensayo de captura de híbridos en microplaca (HC II)
- Reacción en cadena de la polimerasa = PCR

En los últimos 20 años, los avances en el conocimiento de la Virología molecular, se han producido como consecuencia del desarrollo de la Ingeniería Genética y de los métodos de diagnóstico molecular.⁶

Además de las técnicas del laboratorio clínico existen hoy en día métodos moleculares para la detección del VPH. La captura de híbridos se basa en la formación de híbridos de moléculas de DNA viral con sondas específicas de RNA, estos híbridos se exponen al reconocimiento de anticuerpos especialmente diseñados y que se encuentran acoplados a moléculas coloridas, las que son finalmente detectadas en un luminómetro. La captura de híbridos ha sido diseñada para detectar grupos virales, por lo que se puede aplicar para la búsqueda de grupos de virus de bajo riesgo o de alto riesgo.⁶

I.- BASES MOLECULARES FUNDAMENTALES

ÁCIDOS NUCLEICOS

Los ácidos nucleicos son macromoléculas de suma importancia biológica. Todos los organismos vivos contienen ácidos nucleicos en forma de ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). Algunos virus solo contienen ADN, mientras que otros contienen ARN.¹⁷

El ADN constituye el depósito fundamental de la información genética. Esta información es copiada o transcrita en las moléculas de ARN, cuyas secuencias de nucleótidos contienen el código para las secuencias específicas de aminoácidos, entonces se produce la síntesis de las proteínas, en un proceso llamado transducción del ARN. Esta serie de fenómenos ha recibido el nombre de "dogma central de la biología molecular" que puede resumirse de la siguiente manera :



Los ácidos nucleicos están formados por un azúcar (pentosa), una base nitrogenada (purina o pirimidina) y ácido fosfórico.¹⁷

La hidrólisis del ADN o de ARN genera:

	ADN	ARN
Pentosa	desoxirribosa	ribosa
Bases	adenina-guanina timina-citosina	adenina-guanina uracilo-citosina
Ácido fosfórico	PO ₄ H ₃	PO ₄ H ₃

FALTA DE ORIGEN
TESIS CON

Una molécula de ácido nucleico es un polímero lineal en el cual los monómeros son nucleótidos que están ligados por medio de uniones fosfodiéster. Estas uniones ligan al carbono 3' de la pentosa de un nucleótido con carbono 5' de la pentosa del nucleótido adyacente. En consecuencia el eje de un ácido nucleico está formado por pentosas y fosfatos y las bases nitrogenadas están unidas a las pentosas del eje. El extremo de la molécula que contiene la pentosa con el (carbono)C 5' libre se llama extremo 5' y el que posee la pentosa extremo 3'.¹⁷

El ácido fosfórico utiliza dos de sus tres grupos ácidos en las uniones 3', 5'-diéster. El grupo restante confiere al polinucleótido sus propiedades ácidas y permite que las moléculas forme uniones iónicas con proteínas básicas llamadas histonas con las que forma un complejo núcleoproteico denominado cromatina. Dicho grupo ácido libre también hace que los ácidos nucleicos sean basófilos.¹⁷

Las pentosas son de dos tipos: ribosa en el ARN y desoxirribosa en el ADN. La única diferencia entre dos azúcares es que la desoxirribosa tiene un átomo menos de oxígeno. Se puede utilizar una reacción específica para la desoxirribosa, llamada reacción de Fulgen para visualizar el ADN con el microscopio óptico.¹⁷

Las bases que se encuentran en los ácidos nucleicos son también de dos tipos; pirimidinas y purinas. Las pirimidinas poseen un anillo heterocíclico mientras que las purinas tienen dos anillos fusionados. En el ADN las pirimidinas son la timina (T) y la citosina (C) y las purinas son la adenina (A) y la guanina (G). El ARN contiene uracilo (U) en lugar de timina. La diferencia de las bases pirimídicas permite usar timidita radiactiva como marcador específico del ADN y uridina radiactiva para el ARN. Las bases heterocíclicas absorben luz ultravioleta a 260 nm. La combinación de una base más una pentosa (sin el fosfato) constituye un nucleósido, por ejemplo adenina + ribosa = adenosina. Finalmente adenosina monofosfato (AMP), adenosina difosfato y trifosfato son ejemplos de nucleótidos.¹⁷

Además de actuar como bloques en la edificación de los ácidos nucleicos, los nucleótidos son utilizados para depositar y transferir energía química. Cuando se produce la hidrólisis de estas uniones la energía liberada puede ser usada por la

célula para realizar sus funciones. El ADN se encuentra en los organismos vivos como moléculas lineales de muy alto peso molecular.

Toda la información genética de un organismo vivo se encuentra acumulada en la secuencia lineal de las cuatro bases del ácido nucleico. La estructura primaria de todas las proteínas (secuencias de sus 20 aminoácidos) debe estar codificada por un alfabeto de cuatro letras (A, T, G, C) .

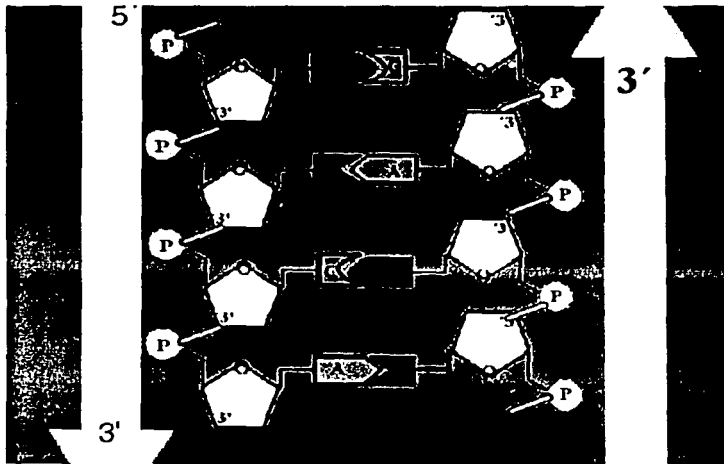


Fig.1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ADN

Es un polímero, es decir; una larga cadena de monómeros unidos entre sí. Cada monómero en el ADN es un nucleótido que está constituido por tres componentes: una base nitrogenada, una pentosa y una molécula de ácido fosfórico.⁸

La molécula de ADN está formada por dos cadenas de ácidos nucleicos helicoidales con giro a la derecha, que componen una doble hélice alrededor de un mismo eje central. Las dos cadenas son antiparalelas, es decir sus uniones son 3',5' fosfodiéster siguen direcciones opuestas, además las bases están situadas en el interior de la hélice en un plano helicoidal. Ambas cadenas se hallan unidas por medio de puentes de hidrógeno establecidas en pares de bases.^{8, 17}

Puesto que entre dos pentosas de las cadenas opuestas existe una distancia fija, sólo ciertos pares de bases pueden darse dentro de la estructura. Los únicos pares posibles son: A-T, T-A, C-G y G-C. Entre la A y la T se forman dos puentes de hidrógeno y entre las C y G, tres puentes, el par C-G es más estable que el par A y T. Junto los enlaces de hidrógeno, las interacciones hidrofóbicas entre las bases mantienen estabilizada la cadena.¹⁷

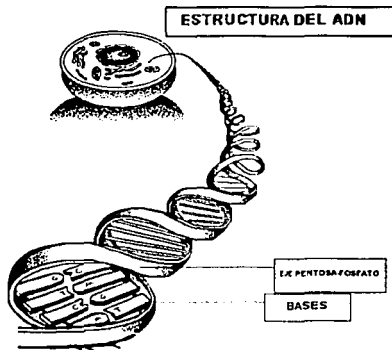


Fig. 2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Bases nitrogenadas

Las bases nitrogenadas ; adenina, guanina, citosina, timina y uracilo son las bases encontradas en el ADN y en el ARN. Suelen nombrarse con sus iniciales A, G, C, T y U. En el ADN hay A,G,C y T.

La adenina y la guanina son bases púricas constituidas por dos anillos. La citosina y timina son bases pirimidicas de menor peso molecular, constituidos por un solo anillo. Ambos tipos de bases contienen varios dobles enlaces y los átomos de hidrógeno, de modo que las bases pueden existir indiferentes formas llamadas tautoméricas dependiendo de la colocación relativa de los dobles enlaces y los átomos de hidrógeno.¹⁷

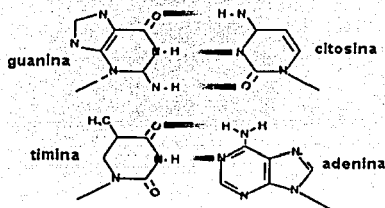


Fig. 3

- Pentosa

El segundo componente es una molécula de azúcar de cinco carbonos. Las pentosas pueden existir en forma de cadena lineal extendida o en anillo, aunque tanto en el ADN como el ARN se encuentra el anillo . En el ADN la pentosa es la 2'desoxirribosa y en el ARN ribosa. La diferencia entre ambas reside en que el carbono en posición 2' grupo hidroxilo (-OH) está sustituido por un átomo de hidrógeno(-H). En el azúcar los átomos de carbono se numeran 1',2'comenzando por el carbono del grupo carbonilo (-C=O) de un extremo de la cadena. Los átomos de carbono se numeran 1, 2 para distinguirlos de los carbonos de azúcar 1', 2' ¹⁷

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II.-VIRUS

Virus significa "veneno"



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los virus son partículas infecciosas muy pequeñas, parásitos genéticos obligados que carecen de organelos y metabolismo propio por lo que para su reproducción dependen por completo de los sistemas de replicación y expresión genética de sus huéspedes para poder realizar la suya propia.^{8, 15}

Contienen ADN o ARN con la información necesaria para reproducirse pero carecen la mayoría de las veces de las polimerasas o ribosomas para realizar su propia replicación o síntesis de proteínas. Tienen un cromosoma de ADN o ARN con unos pocos nucleótidos que es pequeño comparado con el de los eucariotas. Debido a esto se llegan a conocer en su totalidad gen a gen, nucleótido a nucleótido, además pueden obtenerse cientos de miles de descendientes tras algunos experimentos.^{8, 15}

ESTRUCTURA

Los virus consisten en un genoma de ácido nucleico rodeado por una cápside viral, algunas veces encerrada en una envoltura ; a ésto se le llama virión o partícula viral^{9, 14, 15}

El tamaño se mide en nanómetros(nm) y los viriones de importancia clínica oscilan desde 18 a 300 nm⁹

El virión puede contener enzimas esenciales o accesorias , así como proteínas que asociadas al genoma forman la nucleocápside. El genoma consiste en ADN ó ARN. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario, lineal o circular. El ARN puede ser sentido positivo (como ARNm), negativo, bicatenario o

ambisentido.^{9,15} La capa exterior cápside(del griego *capsa*, caja) ó envoltura proporcionan recubrimiento, protección y sirven como vehículo de transporte para la transmisión del virus. La cápside es una estructura rígida, formada por capsómeros y éstos a su vez formados por protámeros; subunidades proteicas capaces de soportar factores ambientales desfavorables.^{9, 15}

La disposición de la nucleocápside en el espacio nos da la simetría viral y de acuerdo con ello se observan distintos tipos; simetría helicoidal (cilíndrica extendida o enrollada en sí misma), icosaédrica (aspecto de poliedro con veinte caras triangulares, 30 aristas, 12 vértices y tres ejes de simetría) binaria(en un mismo virus dos simetrías) o compleja(ovoides, esféricos o pleomórficos).¹⁵

La envoltura es una membrana compuesta de lípidos, proteínas y glucoproteínas; los virus con envoltura deben permanecer húmedos y se transmiten de modo habitual a través de fluidos, gotitas respiratorias, sangre y tejidos.⁹

En la envoltura se encuentran proyecciones, espículas o peplómeros que sirven de fijación, pueden unirse a glóbulos rojos y provocar aglutinación(*in vitro*)¹⁵

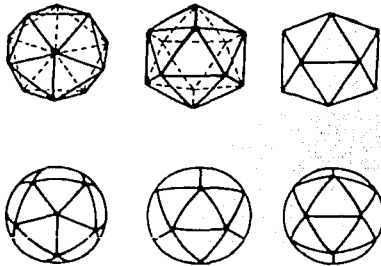


Fig. 4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CLASIFICACIÓN

Los virus se clasifican de acuerdo a : 1) su genoma de ácido nucleico(ARN – ADN monocatenario/bicatenario) 2) la presencia de un envoltorio y 3) la morfología de la cápside viral^{14,15}

INTERACCIÓN VIRUS-CÉLULA

- Fijación

La primera etapa de la infección vírica es la fijación del virión a la célula objetivo, varias estructuras de la superficie celular pueden actuar como receptores para ellos o bien la entrada del virus puede estar orientada hacia células específicas (tropismo celular) éste determina la enfermedad clínica órgano específica^{14,15}

Una vez fijados a la superficie celular, los virus tienen que entrar al citoplasma celular para que puedan desnudarse y liberar el ácido nucleico. Los virus envueltos consiguen esto por medio de la fusión tras la endocitosis mediada por receptores¹⁴

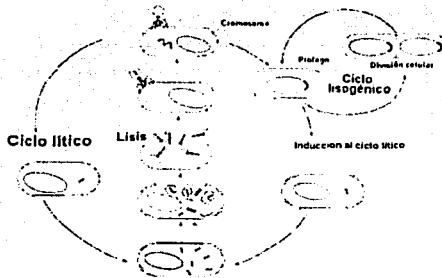


Fig. 5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-Replicación viral

Una vez que el virus ha entrado en una célula y ha liberado su genoma, necesita expresar los genes virales y replicar su ácido nucleico, la estrategia para esto depende de la naturaleza del virus¹⁴

La célula infectada proporciona los sustratos, la energía y la maquinaria necesaria para la síntesis de proteínas víricas y la replicación del genoma. La competencia entre el virus y la célula por la maquinaria biosintética determinan el destino de la célula y la naturaleza de la infección vírica; la síntesis de macromoléculas víricas continúa al ensamblaje y la liberación de la progenie vírica; todos los virus fabrican ARNm y proteínas para generar una copia idéntica de su genoma.^{9,15}

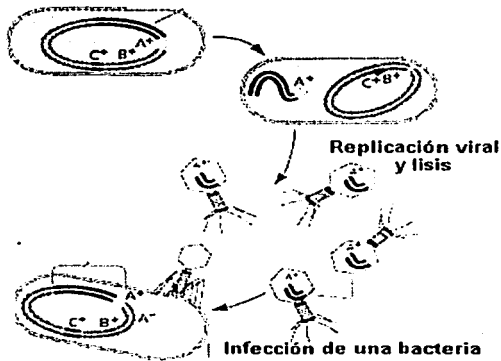


Fig. 6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-Transcripción

Una vez introducido el genoma vírico deben ser transcrito en ARN mensajeros funcionales capaces de unirse a los ribosomas y ser traducidos en proteínas tempranas, éstas detienen el metabolismo celular para permitir la multiplicación viral. Luego se producen las proteínas destinadas a la síntesis y procesamiento del ácido nucleico y por último las tardías que forman la estructura y se unen al genoma. El medio por el que cada virus realiza éstos pasos depende de la estructura del genoma y del lugar de replicación^{9,14,15}

La maquinaria para la transcripción y el procesamiento de ARNm se encuentra en el núcleo; los virus de ADN pueden aprovechar la ADN polimerasa II dependiente del ADN y otras enzimas para fabricar ARN. Los virus que se multiplican en el citoplasma deben realizar por ellos mismos éstas funciones^{9,15}

Los virus de ARN deben codificar enzimas necesarias para la replicación y transcripción puesto que la célula carece de medios para replicar ARN⁹

La replicación del virus puede iniciar cambios en las células que conducen a histólisis o cambios en propiedades funcionales o en las características antigénicas de la célula. Los efectos sobre las células pueden deberse a la utilización por parte del virus de la maquinaria para síntesis de macromoléculas, a la acumulación de proteínas o partículas víricas o modificación estructural celular como la incorporación de glucoproteínas en las membranas.

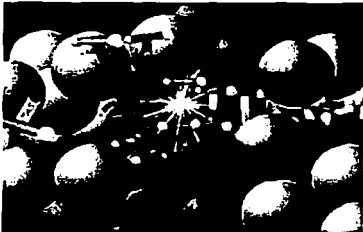


Fig 7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-Ensamblaje y liberación

La unión se lleva a cabo en el citoplasma o en el núcleo, finalmente los virus son trasladados a través del citoplasma en vesículas que se fusionan con la membrana celular y finalmente salen de la célula. En los virus sin envoltura se produce lisis de la célula. Cuando la maduración es completa la célula puede sufrir distintos efectos; de ser virus moderados o atemperados la célula no se ve alterada, pero si la maduración no fue completa entonces se habla de infección abortiva.¹⁵

Cuando los virus no se liberan y persisten en el interior de la célula, producen transformaciones en ella. Éstos son virus oncogénicos¹⁵

PATOGENIA VÍRICA

El virus entra al organismo a través de fisuras en la piel o en las membranas muco-epiteliales existentes en los orificios corporales (ojos, tracto respiratorio, boca, genitales y tracto gastrointestinal) . Una vez dentro del organismo, el virus se replica en células receptores específicos y tienen una maquinaria biosintética apropiada. Los síntomas pueden acompañarse o no de replicación vírica en el foco primario. El virus puede multiplicarse y permanecer en el sitio primario o diseminarse a otros tejidos por medio del torrente sanguíneo, el virus puede alcanzar el torrente linfático o sanguíneo, tras inducir lesión celular por fagocitosis o mediante transporte de activos. Muchos virus infectan y son transportados por las células muco-epiteliales de la orofaringe y los tractos gastrointestinal, vaginal y anal.^{9,15}

El periodo inicial se conoce como pródromo o periodo de incubación; durante éste periodo el virus se multiplica antes de alcanzar el tejido diana o inducir lesión suficiente para que aparezcan los síntomas. El periodo es relativamente corto si la infección en el foco primario produce los síntomas característicos de la enfermedad.⁹

Las enfermedades pueden ser aparentes o inaparentes y producir enfermedad aguda o crónica. Las infecciones inaparentes se detectan por la presencia de anticuerpos específicos contra el virus. La susceptibilidad del individuo y la gravedad de la enfermedad dependen de factores como nivel de exposición, estado inmune, salud general, dosis del virus y características genéticas tanto del virus como del huésped.^{9,15}

La infección viral de una célula puede conducir a tres resultados; infección fracasada (infección abortiva) , muerte celular (infección lítica) o multiplicación vírica sin muerte celular (infección persistente no lítica) . Las infecciones persistentes pueden ser crónicas, latentes, recurrentes y transformadoras (inmortalizadas).La naturaleza de la infección está determinada por las características tanto del virus como de las células. Una célula no permisiva no permitirá la replicación de un tipo o cepa particular de virus .Una célula permisiva proporcionará la maquinaria biosintética necesaria para permitir el ciclo replicativo completo del virus. Una célula semipermisiva puede ser muy ineficaz o permitir algunas pero no todas las fases víricas de la replicación vírica.⁹

Cuando el virus infecta una células sin matarla se produce una infección persistente . En la infección persistente productiva; los virus de la progenie salen de la célula sin causar daño aparente por exocitosis o gemación a través de la membrana plasmática. Se produce una infección latente cuando un virus ADN infecta células que carecen de la maquinaria necesaria para transcribir todos los genes víricos (o que no permiten su uso por el virus) . Los factores de transcripción específicos requeridos por un virus quizá se expresen sólo en determinados tejidos por células en fase de reproducción , pero no por las que están en fase de reposo o tras la inducción por hormonas o citoquinas.⁹

VIRUS ADN

La transcripción de éstos virus ocurre en el núcleo; utilizan polimerasas y enzimas de las células huéspedes para la síntesis de ARN vírico. La síntesis de ADN y ARNm víricos se pueden potenciar al acelerar el crecimiento de las células o aumentar el número de plantillas ADN para la transcripción después de la replicación del genoma. La transcripción de los genes víricos está regulada por la interacción de la proteína de unión al ADN con elementos facilitadores y potencializadores víricos presentes en el genoma vírico; éstos tienen secuencias similares para permitir la unión de los factores de activación de la transcripción celulares y la ARN polimerasa dependiente del ADN.⁹

Se transcriben primero ARNm para productos genéticos precoces (proteínas no estructurales) que son con frecuencia proteínas y enzimas relacionadas con ADN, incluyendo polimerasas. La replicación del genoma suelen iniciar una transición a la transcripción de productos génicos tardíos; éstos codifican proteínas estructurales. Los genes víricos recién replicados proporcionan nuevas plantillas que amplifican la síntesis de ARNm de los genes tardíos. Además pueden ser transcritos desde cualquiera de las cadenas del genoma y en direcciones opuestas. Por ejemplo; los genes precoces y tardíos de los Papovavirus y adenovirus, son transcritos inicialmente como ARN largo a partir de un solo promotor y después son procesados para producir varios ARN de secuencias intermedias (intrones).^{9,14}

Las polimerasas víricas son más rápidas pero menos precisas que las del huésped, lo que causa una tasa de mutación alta en los virus. Los virus ADN mayores pueden proporcionar enzimas y otras proteínas que estimulan el crecimiento celular y aumentan la cantidad de deoxosribonucleicos, como el E7 de los papilomavirus.^{9,14}

Las proteínas celulares indispensables para el control de ciclo, cuya consecuencia es la división celular descontrolada y la transformación neoplásica.

Muchos de los primeros genes expresados por casi todos los virus de ADN durante la infección poseen características similares. No sólo activan genes virales precoces y tardíos, sino que también regulan la expresión génica celular con el fin de optimizar el medio celular para la producción del virus. ¹⁴

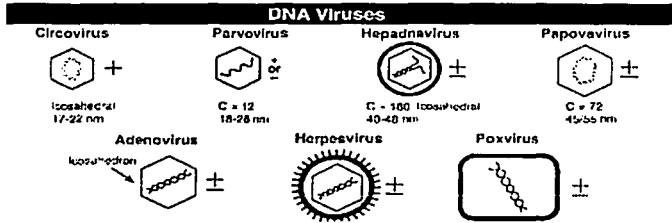


Fig.8

VIRUS ONCOGÉNICOS

Algunos virus ADN y retrovirus establecen infecciones persistentes que pueden estimular el crecimiento celular incontrolado causando transformación o inmortalización de la célula. Las características de las células transformadas incluyen crecimiento continuado sin senescencia, alteraciones en la morfología y metabolismo celulares, aumento en la tasa de crecimiento celular y del transporte de azúcares, pérdida de inhibición del crecimiento por contacto con otras células y capacidad para crecer en suspensión o en agar semisólido. ¹⁵

Los virus tienen diferentes mecanismos para inmortalizar a las células; favoreciendo o proporcionando genes estimuladores del crecimiento o mediante la eliminación de mecanismos de subescisión intrínsecos que normalmente limitan la síntesis de ADN y el crecimiento celular. La inmortalización ocurre en células semipermissivas que sólo expresan los genes víricos precoces. La

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

síntesis de ADN vírico y la progresión hasta la fase tardía de síntesis de ARNm y proteínas suelen causar muerte celular lo que impide la inmortalización.^{15,16}

La transformación vírica es el primer paso pero no resulta suficiente para la oncogénesis y la formación del tumor. Las células inmortalizadas experimentan mayor riesgo que las normales de acumular otras mutaciones o reorganizaciones cromosómicas en el transcurso del tiempo, lo que favorece el desarrollo de células tumorales, así mismo éstas células se muestran más susceptibles a cofactores y promotores tumorales, lo que facilita la formación neoplásica.

Aproximadamente el 15% del cáncer humano se relaciona virus oncogénicos como el virus de la hepatitis B; el papiloma virus 16 y 18, el virus herpes simple tipo 2 y el virus Epstein Barr.¹⁶

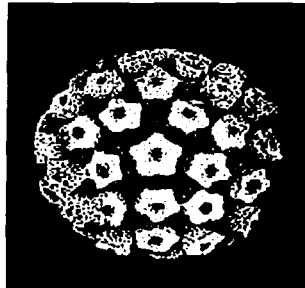
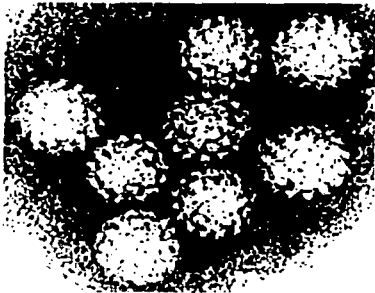
Existe una íntima relación entre la expresión de los genomas de la célula huésped y el virus, ya que se requiere de ambos para la formación y desarrollo de tumores malignos. Algunos patrones familiares se han asociado a ciertas formas de neoplasias, además de los factores genéticos el envejecimiento en el huésped desempeña una función importante en la susceptibilidad de las células a los virus oncogénicos.¹⁶

Muchos virus tienen una molécula de ADN circular que se identifica con el microscopio electrónico como una estructura superenrollada; el cual es negativo, lo cual hace que la estructura del ADN se encuentre bajo tensión. Éste fenómeno se produce por un relativo número de vueltas negativas en la doble hélice del ADN circular. En el ADN de superenrollamiento el número de 10 pares de bases por cada vuelta de hélice, la hélice da una vuelta cada 10.5 nucleótidos.^{15,16}

III.-VIRUS PAPILOMA HUMANO

El virus del papiloma humano pertenece al grupo de *Papovaviridae* en el que están varios virus que infectan tanto a los animales como al hombre produciendo lesiones neoplásicas. Se encuentran en un grupo heterogéneo cuyos diversos genotipos son capaces de producir lesiones en la piel y las mucosas; en la actualidad se sabe que su patrón de crecimiento depende no solamente de su genoma, sino de las condiciones del tejido infectado^{7,9}

Los virus papiloma humano (VPH) son patógenos epiteliales que infectan los queratinocitos de distintos lugares del cuerpo humano. La mayoría de las infecciones inducidas por VPH son auto-limitantes y espontáneamente desaparecen en meses o pocos años; es posible que en algunas personas el DNA viral persista, con niveles de carga viral muy baja en el epitelio por largos períodos de tiempo. Estas infecciones pueden reactivarse a lo largo de la vida o cuando se produce una disminución de las defensas inmunológicas^{7,9}

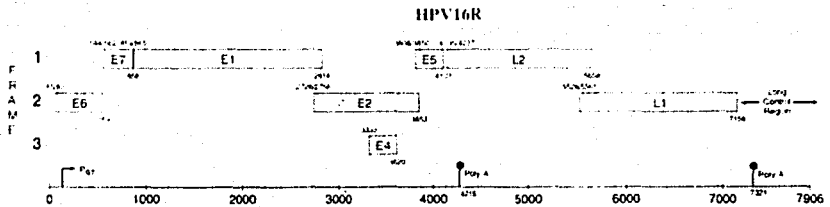


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTRUCTURA

Son un grupo de virus de DNA, que no poseen envoltura, y tienen un diámetro aproximado de 52-55 nm, se replican específicamente en el núcleo de células epiteliales escamosas; son viriones epiteliotrópicos y su genoma mide aproximadamente 8 kilobases de longitud, con un peso molecular de 5×10^6 daltons, icosaédricos no encapsulados con un diámetro de 50 nm.^{7,9}

Las partículas virales están compuestas por una cápside proteica, conformada en un 95% por la proteína L1 y en un 5% por la proteína L2, las cuales se ensamblan para formar 72 capsómeros icosaédricos. Hacia el interior de la cápside se encuentra un DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8500 pares de bases, constituido por ocho genes y una región regulatoria no codificante, la cual contiene sitios de unión para factores proteicos y hormonales del hospedero necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación, las regiones de ADN de los VPH que codifican proteínas virales están localizadas en una cadena plus que se subdivide en una región temprana y otra tardía; aquellos que son codificados en las etapas tempranas de la infección, conocidos como genes E (del inglés Early = temprano), y aquellos que son codificados durante las etapas tardías del ciclo replicativo del mismo, conocidos como L (del inglés Late = tardío). Son seis genes tempranos: E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (aunque se considera que E4 es en realidad un gen tardío; la secuencia de este gen, está totalmente contenida dentro de la secuencia del gen E2, pero en un marco de lectura diferente), E6 destruye p53, en la mitad de los casos de neoplasias malignas se descompone y dos tardíos: L1 y L2.⁹



Los genes tempranos codifican proteínas involucradas en la replicación y regulación viral, así como en su capacidad carcinogénica. Estas proteínas son las encargadas de favorecer el crecimiento celular; en una célula permisiva, esto facilita la replicación viral lítica. Sin embargo ellas mismas pueden inducir transformación oncogénica en una célula no permisiva⁹

Por otro lado los genes tardíos codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral. La región de control posee sitios de unión para elementos reguladores del ciclo reproductivo viral.

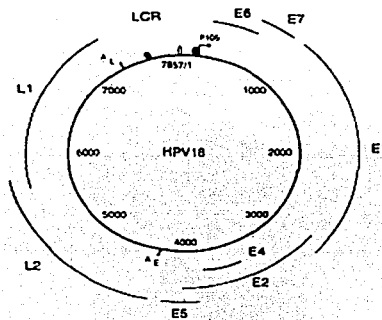


Fig. 10

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

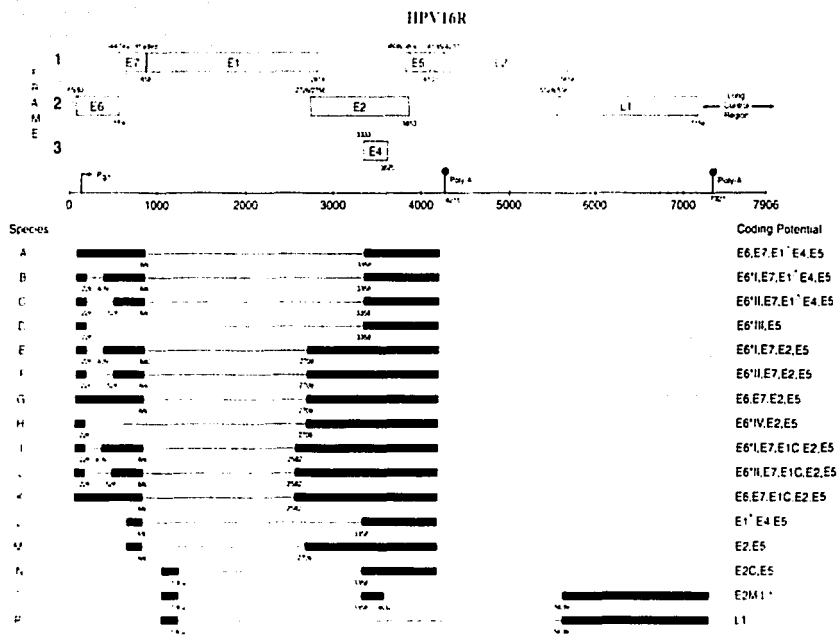


Fig.11

REPLICACIÓN

El ciclo de los VPH esta estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas. El virus se une a su célula blanco a través de un receptor de membrana, la molécula $\alpha 6$ -Integrina y se establece dentro del núcleo, de ésta forma inicia su ciclo productivo infectando a las células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio. El DNA viral permanece en estado episomal (circular) fuera de los cromosomas del hospedero, replicándose a niveles muy bajos en coordinación con la división celular e inicia la transcripción de sus genes. Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo. La forma en que el VPH alcanza las células de los estratos bajos del epitelio es a través de lesiones, micro-heridas y abrasiones del tejido. El análisis de las moléculas de RNA mensajero viral durante las diferentes etapas de diferenciación de las células infectadas demuestra que la expresión de los genes tempranos ocurre a lo largo de todos los estratos epiteliales, sin embargo la expresión de los genes tardíos se observa únicamente en los queratinocitos totalmente diferenciados de los estratos córneos, donde también ocurre el ensamblado de las cápsides virales que dan lugar a la formación de viriones. Los VPH no presentan una fase lítica, por lo tanto se valen de las características propias de las células que los albergan para propagar su progenie, la cual es liberada cuando las células terminales del estrato córneo sufren un proceso de descamación.

CLASIFICACIÓN

Sobre la base de la homología de la secuencia del ADN se han identificado más de 200 tipos de VPH clasificados en 16 grupos. Pueden clasificarse también como cutáneos o mucosos de acuerdo con el lugar de infección y replicación.⁹

TIPO DE VPH	LESIÓN ASOCIADA
<u>Cutáneos</u>	
1,4	Verruca plantaris
2,4	Verruca vulgaris
3,10	Verruca plana
5,8,14,17,20	Epidermodisplasia verruciformis
7	Verrugas del carnicero
9,12,15,19,21-25,36,46,47	Epidermodisplasia verruciformis
41	Carcinoma de células escamosas cutáneas
<u>Mucosos</u>	
6	Condiloma acuminado
11	Papiloma laríngeo
13,32	Hiperplasia epitelial focal
16,18,31,33,35,45,51,52,56	NIC, Carcinoma de cérvix
30	NIC, Carcinoma laríngeo
39	NIC, Carcinoma de cérvix y pene
34,58	NIC
40	NIC, NIP
42	NIC, papiloma vulvar
43	NIC, hiperplasia vulvar
44	NIC, condiloma vulvar
54	Condiloma acuminado
55	Papulosis Bowenoides
57	NIC
59	NIV

NIC = Neoplasia intraepitelial del cérvix
NIP = Neoplasia intraepitelial del pene
NIV = Neoplasia intraepitelial de la vulva

Fig.12

Existen variantes de cada tipo de VPH encontrados que difieren entre ellas en más del 10 % . La distribución de las variantes de papilomas refleja los movimientos geográficos humanos . Se conocen las siguientes variantes; Asiático- americana,

Asiática, Europea, y dos tipos de Africana. En México la variante mayor es la asiática americana. Se cree que ésta tiene un riesgo relativamente mayor que las restantes al desarrollo de cáncer.²⁴



Fig.13

PATOGENIA

El VPH exhibe un alto grado de tropismo por el epitelio escamoso en diferentes regiones corporales. Los tipos virales que inducen lesiones anogenitales se encuentran solamente en la región genital, mientras que los tipos asociados con verrugas cutáneas en manos y pies se encuentran restringidos a dichas áreas. Es posible que las diferencias en la distribución de los receptores para el VPH en dichas células sea un factor importante para la presencia restringida de tipos específicos de VPH, sin embargo los elementos más importantes que determinan la especificidad de los virus son los factores de transcripción producidos por las células hospederas. La expresión de los genes de los diferentes tipos de VPH la regulan de manera estricta y específica factores de transcripción, como AP-1, el factor específico de keratinocitos, NF-1/CTF, CEF1, CEFII y TEF1 y algunos factores de origen hormonal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

-Infectan células epiteliales cutáneas y mucosas planas poliestratificadas.

-Inducen la aparición de tumores benignos localizados.

-La mayoría de las lesiones regresan espontáneamente.

-Los tumores contienen ADN de VPH

El VPH exhibe un alto grado de tropismo por el epitelio escamoso en diferentes regiones corporales; piel y mucosas. Los tipos individuales de VPH tienen tropismos a huésped y el tejido muy limitados. Los papilomavirus requieren factores nucleares específicos para la transcripción y replicación, característicos de las diferentes capas y tipos de piel y mucosas ⁹

Es posible que las diferencias en la distribución de los receptores para el VPH en dichas células sea un factor importante para la presencia restringida de tipos específicos de VPH, sin embargo los elementos más importantes que determinan la especificidad de los virus son los factores de transcripción producidos por las células hospederas. La expresión de los genes de los diferentes tipos de VPH la regulan de manera estricta y específica factores de transcripción, como AP-1, el factor específico de queratinocitos, NF-1/CTF.^{9,11}

Los tipos virales que inducen lesiones anogenitales se encuentran solamente en la región genital, mientras que los tipos asociados con verrugas cutáneas en manos y pies se encuentran restringidos a dichas áreas.⁹

Infectan el epitelio cutáneo y mucoso replicándose en su interior e induciendo su proliferación; es exclusivamente local y suele regresar de forma espontánea. No obstante el genoma de los VPH puede permanecer en las células infectadas y perpetuar el desarrollo tumoral al incrementar la proliferación celular o prolongar la vida en las células epiteliales.

El virus papiloma humano es un virus DNA de doble cordón que infecta a las células epiteliales de la piel y la mucosa. Las superficies epiteliales son todas las zonas cubiertas por piel, mucosa, o ambas, como la boca, la faringe, la lengua, las amígdalas, la vagina, el pene y el ano. La transmisión del virus ocurre cuando dichas regiones entran en contacto con él, permitiendo su transferencia entre las células epiteliales. Se desconoce por qué ciertos tipos de VPH eligen como blanco a la piel de las manos o los pies, en tanto que algunos más atacan a las células que recubren la boca, e incluso otros, a los genitales tanto masculinos como femeninos. Los VPH más peligrosos, 16 y 18, se transmiten mediante el contacto sexual. Tales virus pueden causar dos clases de tejido anormal: de condiloma y tejido displásico. Los tejidos del primer tipo corresponden a los crecimientos tipo verruga. Éstas son a menudo indoloras, pero producen a veces cierta irritación, comezón o ardor. Esta clase de tejido aparece en la piel como un crecimiento tipo coliflor. Es posible tratarlo en cualquier momento en que exhiba agudización y no es maligno. El tejido displásico consiste en la presencia de células anormales en la superficie de la piel. La displasia no es cáncer, pero corresponde a un cambio del tejido previo a la neoplasia

La infección vírica permanece localizada y en general regresa de manera espontánea. Los papilomavirus permanecen en la capa basal del epitelio y sus genes guardan relación con la fase de diferenciación de la piel.

Entre los métodos usados en estudios epidemiológicos se encuentra la PCR, la cual es útil para la obtención de copias del ADN viral. La serología no es muy usada en estudios de incidencia y prevalencia viral ya que los anticuerpos anti - VPH son encontrados sólo en el 50% de las mujeres con carcinoma cervical invasivo.¹¹

TIPOS DE VPH ENCONTRADOS EN MUCOSA BUCAL

Entre las lesiones encontradas en cavidad bucal y relacionadas al virus están los papilomas, la hiperplasia epitelial focal y leucoplasias.

-VPH tipo 2 ó algunos tipos genitales son encontrados en los papilomas bucales

-VPH tipo 13 y 32 son responsables de la hiperplasia epitelial focal

-VPH 6, 11 y 16 han sido detectadas en leucoplasias bucales

-Se ha detectado el ADN viral en neoplasias malignas de cabeza y cuello, incluyendo carcinomas laríngeos, bucales, faríngeos, nasal y esofágico.

-VPH 11, 16, 18, 30 y 35 ha sido encontrado en cáncer laríngeo.

-VPH 16 es el más comúnmente encontrado en en carcinoma bucal ; éste virus es positivo en éstos tipos de cáncer de un 0-79 % en diferentes investigaciones.

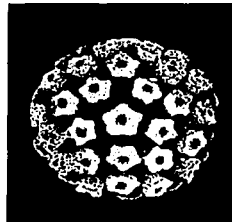
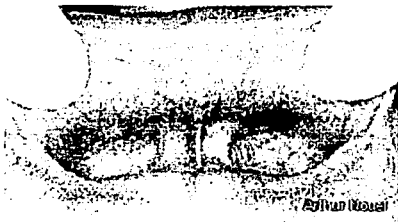


Fig.14

TRANSFORMACIÓN CELULAR MALIGNA

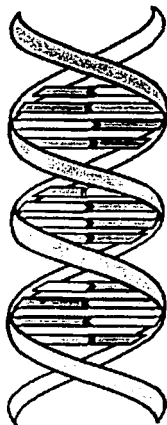
En general los procesos intracelulares que dan por resultado la transformación de las células por acción de los virus oncogénicos de ADN son muy similares a los de la lisogenia de bacterias por parte de bacteriófagos. Un genoma viral de ADN de doble cadena se incorpora a una región parcialmente homóloga del genoma de la célula huésped en donde permanece en una forma denominada provirus o profago. Los cromosomas de las células tienen múltiples sitios de posible integración, de modo que puedan integrar varios provirus al mismo tiempo. La

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

integración exitosa del genoma viral ocasiona una suspensión de la síntesis de los viriones completos y explica las características hereditarias de la lisogenia y transformación. Los primeros experimentos realizados sugerían que sólo un fragmento del genoma viral era necesaria para inducir la transformación celular, mientras que la mayor parte si no toda la capacidad genética del virus, era necesaria para dirigir una infección replicativa. Una serie de complicados experimentos reveló que ocurre algo semejante a la lisogenia, ya que sólo se podía detectar la transcripción de un segmento del ADN viral para formar ARN mensajero en las células transformadas. Algunos investigadores demostraron que la expresión de uno de los genes virales induce la transformación mientras que el producto de otro gen puede ser suficiente para mantener heredable la condición transformada.

Before

VPH



After

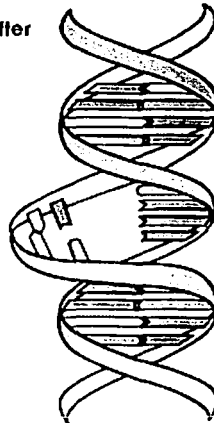


Fig. 15

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV.- EL VPH Y SU GENOMA

Los papilomavirus presentan un elevado grado de especificidad por la especie a la que infectan. Los viriones están compuestos fundamentalmente de una cápside proteica que rodea una molécula de ADN bicatenario circular cerrado de unos 8 kpb, está enrollado en torno a núcleos nucleosómicos formados por cuatro histonas de origen celular. No se conoce ningún sistema de cultivo de tejidos que permita la replicación del virus, que debe ser aislado de las verrugas. Con la llegada de las técnicas de ADN recombinante fue posible la purificación del ADN de los pocos virus de las verrugas y éste ADN fue clonado y amplificado en *E. Coli*. esto ha permitido estudiar las estructuras del genoma. El ADN vírico ha resultado ser un vector único para el trabajo con células animales. Se conoce la secuencia completa de los nucleótidos de los genomas del virus papiloma tanto bovino como humano. El virus bovino es capaz de replicarse como un plásmido estable en muchas células bovinas. Las células infectadas no mueren y el genoma es heredado por las células hijas, transformando las células causando alteraciones fenotípicas heredables, incluyendo la conversión de las células normales en tumores. Esto permite la detección de los transformantes que se aprecian como una colonia de células creciendo apiladas sobre la monocapa transfecta (lo que se conoce como *foco*) Los clones de las células transformadas pueden utilizarse para generar cultivos de forma análoga a una colonia que deriva de una única célula en *E. Coli*, éstas células crecen mucho más rápido que las células normales. Cada célula transformada contiene de 10 a 100 copias del genoma del virus papiloma bovino.

El cáncer se desarrolla a consecuencia de una serie de eventos genéticos y activación de oncogenes e inactivación de genes supresores del tumor. La mutación de éstos genes ; retinoblastoma y p53 han estado asociados a enfermedades hereditarias malignas y ha sido encontrado en un alto porcentaje en neoplasias malignas. El genoma de los papilomavirus puede persistir en la

célula y causar recidiva. Se ha encontrado ADN vírico en neoplasias tanto benignas como malignas. Los VPH 16 y 18 causan papilomas y displasias cervicales y el 85% de ellas contienen ADN viral integrado. Las proteínas E6 y E7 de éstos tipos VPH son oncogenes que se unen a proteínas depresoras del crecimiento (transformación) celular y las inhiben como la proteína p53 que se une a la E6 , la E7 se une al producto del gen del retinoblastoma. Sin los frenos de crecimiento celular, la célula se vuelve más susceptible a las mutaciones, las aberraciones cromosómicas o a la acción de algún cofactor convirtiéndose en neoplásica.⁹

Numerosos tumores benignos y malignos de piel y mucosas están asociadas al VPH, las áreas involucradas incluyen tracto respiratorio, digestivo, conjuntivas y anogenital. Varios tipos de éste virus poseen la característica de ser oncogénicos. Lesiones premalignas y malignas asociadas al virus ocurren en pacientes inmunocomprometidos.¹¹

La inactivación de proteínas nucleares p53 y retinoblastoma juegan un papel esencial en el desarrollo de la carcinogénesis . El papel de éstos genes y sus productos es regular el ciclo celular y controlar la transcripción celular. El retinoblastoma (RB) está localizado en el cromosoma 13 y su producto es la proteína pRB (105kDa) que interactúa con el factor de transcripción E2 en la fase G1 del ciclo celular. Ésta interacción inhibe el factor, induciendo la transcripción de genes involucrando así, la proliferación celular.¹¹

El p53 es un gen localizado en el cromosoma 13, sus productos proteicos regulan la supresión de la transcripción celular, por ésta razón se le ha llamado "el guardián del genoma" ¹¹

El VPH induce neoplasias benignas de células escamosas y puede también representar un factor de riesgo para el desarrollo de cáncer. La replicación viral ocurre a nivel de las capas altas del epitelio, específicamente en los queratinocitos, por lo que las partículas virales maduras pueden ser detectadas

en los núcleos celulares del estrato granular, se encuentran incluidos en la queratina de la capa córnea . La infección *per se* no es suficiente para la carcinogénesis. La progresión tumoral ocurre en un pequeño porcentaje en individuos infectados con VPH y expuestos a mutagénicos químicos o físicos. Cuando el VPH induce neoplasias malignas el intervalo entre la infección y el desarrollo del cáncer puede ser desde meses hasta años. En éstas lesiones no pueden detectarse las partículas vírales maduras pero el ADN del virus persiste y los genes tempranos son expresados. Los productos de éstos genes son las proteínas E5, E6 y E7; se ha mostrado la actividad oncogénica transformadora de éstas , éstas tres proteínas virales interactúan con las proteínas celulares involucrándose en el ciclo celular y de éste modo estimular la proliferación viral e interferir con la diferenciación de las células infectadas. Dos de éstas proteínas ; E6 y E7 cooperan en la transformación celular.

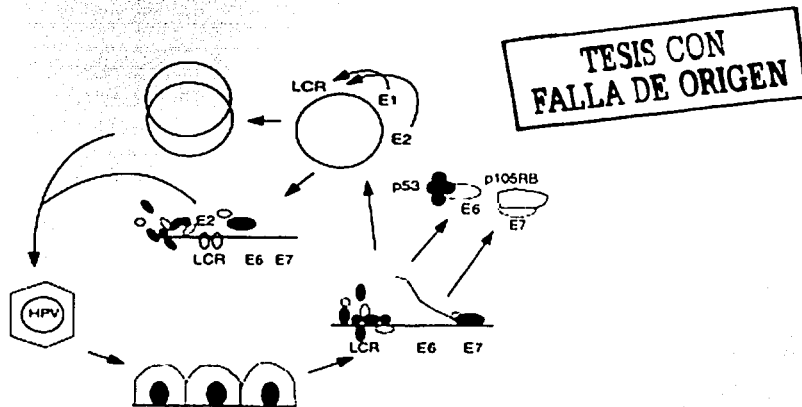


Fig. 16

V.-PROCEDIMIENTOS DE IDENTIFICACIÓN VIRAL

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Esta metodología es útil para virus entéricos producidos en grandes cantidades ya que se requiere un número suficiente de partículas víricas para ser detectadas. La adición de anticuerpos específicos para el virus a una muestra, puede facilitar la detección e identificación simultánea de ellos.⁹



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig. 17

FRACCIONAMIENTO CELULAR

El fraccionamiento celular consiste en la separación y aislamiento de diversos componentes celulares para su posterior estudio mediante técnicas bioquímicas o de biología molecular. Consiste en la homogeneización de los tejidos y la destrucción de los límites celulares por medio de diferentes procedimientos mecánicos o químicos con separación de las fracciones subcelulares de acuerdo con su masa, superficie y peso específico. Actualmente se utilizan diversos métodos de fraccionamiento celular. La mayoría están basados en la homogeneización mecánica de la célula, generalmente en sacarosa a diferentes concentraciones. El fraccionamiento por centrifugación diferencial, se utiliza para subdividir los componentes celulares en cuanto a fracciones diferentes; nuclear,

mitocondrial, microsómico y soluble. Un procedimiento similar se puede utilizarse para separar partículas aún más pequeñas como virus o macromoléculas (ácidos nucleico, proteínas) en la ultracentrífuga analítica, con éste aparato se puede determinar el coeficiente de sedimentación expresado en unidades de Svedberg (S) guarda relación con el peso molecular de la partícula ²

La secuencia de los nucleótidos de un gen puede ser parcialmente deducida a partir de las secuencias de los aminoácidos de la proteína que codifica, parcialmente debido a que éste recurso sólo abarca la parte codificadora del gen y deja de lado los sectores reguladores y los que no codifican (intrones) . Se han desarrollado métodos que permiten un rápido secuenciamiento de ADN: éstos métodos se basan en la producción de fragmentos de ADN de diferentes longitudes que empiezan en un punto fijo y terminan en uno de los cuatro tipos de nucleótidos. Luego esos fragmentos se separan sobre la base de un gel de poliacrilamida en el que se lee la secuencia de los nucleótidos del ADN en el estudio. Las etapas del método de secuenciamiento llamado terminación de cadena que comienza con la desnaturalización del ADN que se quiere analizar a fin de obtener moléculas de una cadena, ésta cadena se copia mediante la ADN polimerasa de la E. Coli que comienza a sintetizar la cadena complementaria luego de haberse colocado en el extremo 3' de la cadena original un cebador es decir un fragmento de ADN que deja expuesto su 3' a partir del cual crece la nueva cadena sintéticamente. La ADN polimerasa agrega los sucesivos nucleótidos como lo hace durante la replicación del ADN ²

DIGESTIÓN CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Las enzimas de restricción tiene numerosas aplicaciones ; se pueden realizar mapas de restricción que son mapas físicos que representan la situación de fragmentos determinados de ADN a lo largo del cromosomas.

Enzimas de restricción: Tienen la propiedad de reconocer secuencias cortas de unos cuatro o seis pares de bases en el ADN de doble hebra y cortar el ADN en todos los puntos donde se encuentre tal secuencia llamada diana de restricción . Cada enzima de restricción tiene una diana particular en el ADN . Se han purificado un gran número de enzimas de restricción procedentes de numerosas bacterias. En la naturaleza sirven para proteger a las bacterias de la penetración del ADN extraño, como el de un virus, pues son capaces de destruirlo al fraccionar las cadenas ADN.³⁶

AMPLIFICACIÓN ENZIMÁTICA DE SEGMENTOS DE ADN REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA (PCR)

Actualmente existe una técnica de amplificación rutinaria denominada **reacción en cadena de polimerasa o PCR** según las iniciales de "polymerase chain reaction" ; permite la obtención de microgramos de copias de ADN a partir de segmentos de ADN o ARN representados hasta por una sola molécula en toda una preparación de ácidos nucleicos.⁸

Este procedimiento permite reproducir cadenas de ADN para su estudio, se pueden reproducir cerca de un billón de copias idénticas en pocas horas. Son cuatro materiales requeridos para éste fin; una cadena de ADN (la cual se quiere amplificar) , cadenas cortas ADN conocidos como "primer" las cuales reconocerán el segmento destinado a replicarse e iniciará el procedimiento, ADN polimerasa.

enzima encargada de la replicación del ADN en las células y finalmente nucleótidos ; que son los bloques conformadores del ácido nucleico.¹⁰

La PCR involucra tres pasos principales y se lleva a cabo completamente *in vitro* ; en el primer paso la cadena de ADN es calentada hasta romper los enlaces entre ambas cadenas, en el segundo paso la temperatura es reducida y los "primer" se unen a la cadena de ADN y es identificada el área a copiar, en el tercer paso la ADN polimerasa cataliza la formación de la nueva cadena de ADN usando como referencia las cadenas presentes de oligonucleótidos cebadores que templadas y que son complementarios a secuencias situadas hacia los extremos 3' del segmento bicatenario que se pretende amplificar.^{8,10}

La síntesis inicia en el punto marcado por el primer. La enzima se mueve a lo largo de la cadena, de ésta forma lee la secuencia de bases, y por medio del templado se van ensamblando las bases formando una nueva cadena, dando como resultado cuatro cadenas de ADN en donde originalmente existían dos. La ADN polimerasa es una enzima especial tolerante a las altas temperaturas llamada *Taq* polimerasa , es derivada de una bacteria termófila : *Thermus aquaticus* aislada por primera vez por Brock T. en 1980 ¹⁰

Para efectuar la reacción de PCR hace falta conocer la región a amplificar para poder preparar los oligonucleótidos que actúen de cebadores de la polimerasa. Para amplificar un segmento de ADN se sintetizan primero dos oligonucleótidos que sean complementarios cada uno, a uno u otro extremo 3' del segmento bicatenario que se pretende amplificar. El objetivo de la PCR es copiar la secuencia de cada hebra comprendida entre las regiones complementarias a los oligonucleótidos cebadores con el ADN desnaturalizado que contiene el segmento a amplificar .⁸

De esta manera tras permitir la hibridación de los cebadores con el ADN desnaturalizado que contiene el segmento a amplificar, se efectúa la copia de las hebras correspondientes utilizando el ADN polimerasa y los cuatro

desoxinucleósidos trifosfato. La extensión a partir de cada cebador está orientada hacia el otro.⁹

Los ADN bicatenarios que resultan son desnaturalizados e hibridados nuevamente con los oligonucleótidos que actúan de cebador y se repite la acción la reacción de polimerización. El ciclo puede repetirse hasta 60 veces. En cada ciclo se dobla la cantidad de segmentos específicos con ADN de doble cadena, debido a que tantas moléculas nuevas como las viejas hibridan con los oligonucleótidos y son copiadas.⁸

La utilización de ADN polimerasas estable a altas temperaturas a partir de la bacteria termófila *Thermus aquaticus* permite efectuar muchos ciclos con una única adición de enzima. Al iniciar la reacción se mezclan el ADN, un cebador, los desoxinucleósidos trifosfato y polimerasa. El ciclo 1 comienza al elevar la temperatura hasta que se alcanza la necesaria para la desnaturalización del ADN. Entonces se enfría la muestra para permitir la hibridación de cebadores. Se calienta la muestra hasta la temperatura óptima de actuación de la polimerasa, lo que permite la síntesis de ADN. El ciclo 2 y todos los subsecuentes comienzan con la desnaturalización del ADN. El proceso completo puede ser automatizado utilizando un bloque de temperatura variable controlado por ordenador. Una reacción completa de PCR tiene lugar sólo en unas horas.

Este proceso puede ser repetido treinta o sesenta veces, cada ciclo comienza con el recalentamiento de las cadenas. Un ciclo tarda de uno a dos minutos y cada nuevo segmento de ADN puede ser templado para formar muchas copias más, de ésta forma el número incrementa geoméricamente: de dos cadenas de ADN pueden originarse millones o billones de ella.¹⁰

Otra ventaja de la enzima es que posee su mayor actividad entre 75 y 96°C. A esta temperatura, el apareamiento de bases entre los oligonucleótidos que actúan de cebador (de unos 20 nucleótidos de longitud) y el ADN es más específico que a 37° C temperatura óptima de la enzima de *E. Coli*. En

consecuencia es menos probable que los cebadores hibriden con secuencias contenidas en segmentos de homología imperfecta con lo que se minimiza el riesgo de amplificaciones no deseadas. La selección de temperatura de hibridación y fuerza iónica adecuadas a la longitud del cebador y a su composición de bases) también permite controlar la especificidad de la amplificación . Esta especificidad puede ser lo suficientemente elevada como para permitir la amplificación simultánea de dos segmentos genómicos diferentes a partir de la muestra de ADN en la presencia de dos pares de cebadores específicos.⁸

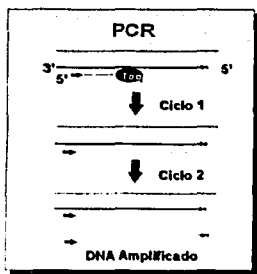
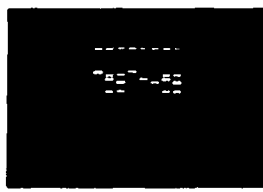
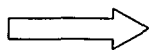


Fig. 17

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



El método sólo es aplicable a la amplificación de fragmentos de ADN previamente clonados y secuenciados . Existen modificaciones que amplían el campo de aplicación del PCR . Una de éstas variantes permite el aislamiento de un gen del que sólo se conoce la secuencia de aminoácidos de una pequeña porción de la proteína que codifica . Tras el PCR el segmento amplificado puede ser purificado y aislado por electroforesis en gel o clonación y utilizado como sonda contra la biblioteca genómica de cADN lo que permite aislar la secuencia codificante que se busca.⁸

Otra posibilidad es amplificar la copia completa de cADN de un RNAm del que sólo se conoce una pequeña región , a partir de un péptido o del propio ARNm . Se copia el ARNm total a cADN de una primera cadena utilizando un cebador de oligodT . Entonces se añade al extremo 3' de cADN una cola (por ejemplo un segmento polid G) utilizando la transferasa terminal.La síntesis de la segunda cadena de cADN se realiza utilizando como cebador un segmento poliC , hasta éste paso no existe especificidad para ARNm . En el próximo paso se utiliza un cebador de corta secuencia homóloga a alguna que esté presente cerca del extremo 3' del ARNm que se pretende amplificar.⁸

La PCR se lleva a cabo utilizando como cebadores esta secuencia y el polidC; la especificidad de la reacción es suficiente para dar un producto casi puro que corresponde a la secuencia completa de ARNm⁸

Aplicaciones de la PCR

-Identificación estructural del genoma y de procesos genómicos:

Una vez que un gen ha sido clonado un par de cebadores puede utilizarse para amplificar los segmentos genómicos correspondientes de varios individuos de una especie.

-Diagnóstico de enfermedades genéticas:

Amplificación de segmentos de ADN dentro de células individuales, tanto en células diploides como en células germinales humanas.

-Determinación de mutaciones :

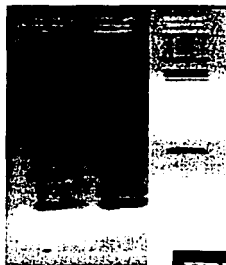
El análisis de las secuencias revela la naturaleza de una mutación o del polimorfismo en el gen, sea un cambio de bases, una delección, una inserción o una reordenación. Diferentes clases de mutaciones pueden ser detectadas si se utilizan cebadores específicos de formas mutantes particulares de un gen determinado.¹²

-Detección de agentes infecciosos víricos:

Los agentes víricos pueden ser detectados aún en presencia de un enorme exceso de ADN de células infectadas.¹²



VPH 16



VPH 18

Fig. 18

Pero la PCR no está exenta de problemas, el principal de ellos es la contaminación, si existe algún contaminante por mínimo que sea, éste será amplificado a lo largo de la cadena, por lo que se debe tener gran cuidado en la toma de muestras por lo que el procedimiento resulta laborioso y el costo se eleva. La PCR no es cuantitativo; puede determinar si un segmento de ADN está presente más no puede cuantificar las cadenas originadas a partir de ella. Así, la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

PCR es usada en conjunción con otras pruebas moleculares para obtener buenos resultados.¹⁰

ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Desde 1950 se fueron descubriendo una variedad de nuevas técnicas para el análisis de enfermedades, éstas basadas en la molécula de ADN; ya sea reproduciéndola, fragmentándola, determinando su composición y/o cambiando su estructura. Su aplicación ha sido en enfermedades infecciosas, detección de factores cancerígenos y patógenos ambientales.¹⁰

Una vez aislada una secuencia de ADN específica mediante clonación, es posible utilizarla como sonda para detectar la presencia y las cantidades de ácidos nucleicos complementarios en mezclas complejas como el ADN o el ARN celular total. Se usan métodos para localizar regiones de ADN que codifican ARNm específicos y los sitios de inicio de transcripción.¹⁷

Teniendo en cuenta que la estructura de doble hélice en el ADN es mantenida por interacciones débiles (puentes de hidrógeno entre las bases enfrentadas), es posible separar ambas cadenas por medio de calor y otros tratamientos como pH alcalino. Este proceso se denomina desnaturalización del ADN. Como la temperatura necesaria para romper el par G - C (que tiene tres puentes de hidrógeno) es mayor que la requerida para romper el par A - T (con dos puentes de hidrógeno), la temperatura a la cual se separan las cadenas, punto de fisión depende de la relación CG/AT. Si el ADN desnaturalizado se enfría lentamente, las cadenas complementarias se aparean en forma ordenada y se restablece la conformación original de la molécula. Éste proceso se denomina renaturalización o templado. Un ADN de una sola cadena también puede unirse a un ARN

complementario para formar una molécula híbrida; con una cadena de ADN y una de ARN

La fusión o desnaturalización del ADN se produce cuando se calienta o se trata con álcali; entonces las fuerzas no covalentes que unen las hebras polinucleótidas se eliminan y las dos hebras complementarias se separan completamente al destruirse todos los enlaces de hidrógeno que las unían. Cuando después se enfría lentamente o se trata suavemente con ácido, el proceso se revierte y la molécula se reconstruye. El punto medio del intervalo de temperatura en el que ocurre la desnaturalización se llama temperatura de fusión y simboliza como T_m ; es característica de cada ADN porque depende de la G y C. Como los pares están unidos por tres enlaces requieren más energía para separarse que los pares AT que están unidos sólo por dos.

Se pueden lograr marcadores utilizando una molécula de ARN mensajero, nucleótidos radioactivos y la enzima transcriptasa inversa que copia una cadena complementaria de ADN llamada ADNc. Éste ADN se puede usar para localizar el gen a partir del cual se formó la molécula de ARN.

SOUTHERN BLOT/HIBRIDACIÓN IN SITU

La técnica Southern blotting o transferencia de Southern, denominada así por su creador, Edwin Southern permite transferir fragmentos de restricción específicos en una mezcla compleja de fragmentos de restricción. Con una enzima de restricción se digiere por completo el ADN que se quiere analizar; generándose millones de fragmentos específicos. La mezcla compleja se somete a electroforesis en gel con el fin de separarlos según su tamaño.¹⁷

Los fragmentos de ADN se llevan desde un gel en el que se ha realizado la electroforesis, para continuar con la técnica de hibridación; se desnaturalizan con un álcali y se transfieren en "blotting" a un filtro de nitrocelulosa o una membrana de nailón. Este procedimiento mantiene la distribución de los fragmentos en el gel

y crea una réplica de gel sobre el filtro. Así se puede realizar la hibridación sobre fragmentos concretos de los previamente separados por electroforesis. Se incuba el filtro bajo condiciones de hibridación con una sonda específica con marca radioactiva, que se genera a partir de un fragmento de restricción clonado. En la actualidad esta técnica se ha mejorado utilizando, en lugar de ADN radioactivo ADN marcado con biotina o dioxigenina, la técnica consiste en hibridar el ADN nativo con un ADN que se ha sintetizado utilizando dATP, dCTP, dTTP y dig. DUTP a continuación se utiliza un anticuerpo específico que reconoce la dioxigenina y se une a ella y la posición del anticuerpo se revela coloreando con un reactivo apropiado. Una variación es la *in situ* que tiene el mismo fundamento pero en lugar de hacer la hibridación sobre una preparación al microscopio óptico con los cromosomas visibles, permite ver el lugar de los cromosomas en donde se encuentra el ADN que hemos hibridado.¹⁷

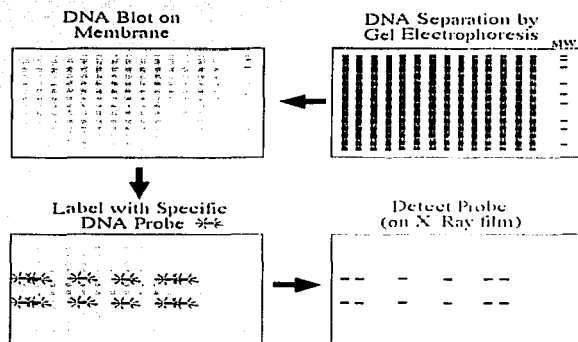


Fig 19

FALLA DE ORIGEN

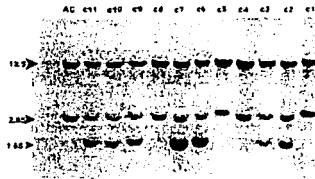
Aplicaciones

-Comparar el mapa de restricción de un ADN aislado directamente de un organismo y el mapa de un ADN clonado.

-Graficar mapas de los sitios de restricción del ADN genómico adyacente a la secuencia de un fragmento de ADN clonado

- Detectar mutaciones por deleción y por inserción.¹⁷

. Durante el año 1980 se presentó un problema ya que en algunas muestras las cadenas de ADN en estudio eran insuficientes para ser detectadas por la sonda y ésta podría hibridar con otras secuencias competitivas, por lo que se requirió amplificar la cadena de ADN. El procedimiento que se desarrollo para éste fin es el llamado reacción en cadena de polimerasa.¹⁰



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Fig.20

HIBRIDACIÓN

La posibilidad de desnaturizar y renaturalizar el ADN permite la hibridación de ácidos nucleicos. Esto se consigue al desnaturizar dos moléculas diferentes y ponerlas luego en condiciones de renaturalización, con el objeto de que si existen secuencias complementarias en las dos moléculas diferentes, éstas pueden encontrarse y aparear formando segmentos de hebra llamados heterodúplex. También puede hacerse hibridación entre ADN y ARN, desnaturalización el ADN y poniendo las hebras simples en contacto con el ARN; si existen secuencias complementarias se formarán heterodúplex ADN-ARN. Como es obvio cuanto más parecidas sean las dos moléculas que se ponen a hibridar, mayor será la extensión de la heterodúplex. Esto permite numerosos experimentos al poder comparar ADN y ARN de distintas procedencias. Otra técnica elemental en el análisis de ADN mediante fragmentos de ADN, llamados "sondas" descubierta en 1970, que son cadenas complementarias a fragmentos de ADN en el material celular que al ubicarse en una localización señalan el fragmento.

Una sonda de ADN es una cadena única relativamente pequeña que puede reconocer y complementar un segmento largo de ADN debido a que las bases siempre se acoplan de la misma forma; A – T y G- C. Por este motivo las sondas de ADN tienen una alta especificidad en la detección de secuencias para la detección de una cadena o de un fragmento de ella.¹⁰

Dentro de la célula el ADN impulsa a la formación de ARN complementario de tipo mensajero ARNm. Ésta molécula puede ser aislada y en combinación con una enzima; la transcriptasa reversa y los nucleótidos apropiados pueden ser utilizados para sintetizar una molécula de ADN idéntica a la originaria. Ahora ésta nueva molécula de ADN será usada como una sonda en la detección del ADN nuclear.¹⁰

Una sonda de ADN puede ser tan corta que contenga solamente 10 pares de bases o bien, llegar a ser tan larga conteniendo 10000 pares de bases.¹⁰

La doble cadena de ADN puede desacoplarse sus bases bajo condiciones de laboratorio determinadas como son; salinidad, temperatura y pH. Las bases de secuencias nucleotídicas se disocian a una temperatura de 90°C, un pH alto de 10.5 y/o a la exposición a sustancias químicas como lo son la urea y el formaldehído. A este proceso se le llama *desnaturalización*.¹⁰

Este proceso puede revertirse si las condiciones antes mencionadas son reestablecidas, de esta forma ambas cadenas serán reensambladas a su forma original, a este proceso se le llama *renaturalización* o *hibridación*. Cuando el propósito es detectar este enlace se utilizan sustancias marcadoras en las sondas como radioisótopos que al emitir la radioactividad señalan que esta unión ha ocurrido.¹⁰

Para llevar a cabo la técnica primero se desnaturalizan por separado con calor o álcali, los dos ADN que se van a hibridar, o si se van a hibridar con ARN se desnaturaliza el ADN. También es necesario que uno de los ácidos nucleicos esté marcado, para poder reconocer luego la heterodúplex que se haya formado. Se desnaturaliza el ADN no marcado y las hebras simples se retienen en un filtro de nitrocelulosa para impedir que se renaturalicen entre sí, adquiriendo la estructura nativa.¹⁰

Entonces el ARN radioactivo o las hebras simples radioactivas del otro ADN que se quiere hibridar se ponen en contacto, en condiciones que permiten la hibridación con las hebras simples retenidas en el filtro. Si existen secuencias complementarias entre ambos tipos de ácidos nucleicos se forman heterodúplex, en caso contrario no se formarán. A continuación se lava bien el filtro para eliminar todas las moléculas que no hayan hibridado y se trata con nucleasas de hebra simple que son enzimas que digieren ácidos nucleicos de hebra simple, de esta manera quedarán sobre el filtro, exclusivamente los heterodúplex.^{10, 36}

La hibridación in situ es la hibridación de fragmentos marcados de ADN de una hebra o de ARN con secuencias complementarias (sondas) a ADN/ARN celular, que en condiciones apropiadas forman híbridos estables. En general, la hibridación puede hacerse sobre soportes sólidos (filtros de nylon o nitrocelulosa), en solución (in vitro) o en cortes de tejido o preparaciones celulares (in situ). Se pueden utilizar sondas marcadas con elementos radioactivos, pero como se necesita protección y manipulación especiales, no son de elección para su uso rutinario.^{10, 36}

Las técnicas no-isotópicas o colorimétricas son más rápidas y permiten una localización más precisa de la reacción. Las sondas marcadas sin elementos radioactivos son más estables y más baratas. La sensibilidad es igual o levemente inferior a la de los métodos isotópicos. Se han utilizado sondas marcadas con biotina y digoxigenina.³⁶

La sensibilidad de la técnica depende de:

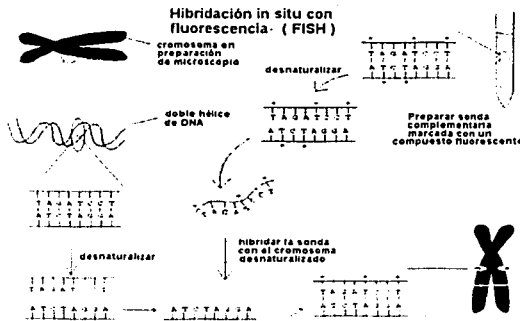
- 1) efecto de la preparación del tejido sobre la retención y accesibilidad de ADN celular blanco o ARN,
- 2) tipos de sondas, eficiencia de la marcación de la sonda y sensibilidad del método utilizado para la detección de la señal y
- 3) efecto de las condiciones de hibridación in situ sobre la eficiencia de la hibridación.

La hibridación in situ se utiliza primordialmente en la detección de bajo número de copias de virus, en particular virus como agentes infecciosos (CMV) y como agentes carcinógenos (HPV, HBV, EBV).³⁶



HIBRIDACIÓN IN SITU POR FLUORESCENCIA

La FISH es una nueva tecnología que utiliza sondas de DNA marcadas con fluorescencia para detectar o confirmar anomalías génicas o cromosómicas que generalmente están más allá del poder de resolución de la citogenética de rutina. Primero, la muestra de DNA (cromosomas metafásicos o núcleos en interfase) se **desnaturaliza**, proceso que separa las hebras complementarias de la estructura en doble hélice del DNA. A la muestra desnaturalizada se le añade entonces la sonda de interés, marcada con fluorescencia, que se hibridará al DNA de la muestra en el sitio diana, en el proceso denominado **templado**, donde se vuelve a formar una doble hélice. La señal de la sonda se observa mediante un microscopio de fluorescencia y la muestra de DNA se clasifica según la presencia o ausencia de la señal.³⁶



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Fig 21

SISTEMA DE CAPTURA DE HÍBRIDOS

1 – CAPTURA HÍBRIDA I – HCT - TÉCNICA EN TUBOS.

El Sistema de Captura Híbrida (HCS), es una nueva generación de test de hibridación en solución con señal de amplificación, que ha sido desarrollado por Digene Corporation y aprobado por la FDA (Food and Drug Administration de los EE.UU.). Experiencias realizadas mundialmente desde inicios del 90, han demostrado que este test tiene una sensibilidad que varía entre el 70% al 96.8%. Cuando la Captura Híbrida se utiliza en conjunto con otras técnicas, la detección de lesiones de alto grado se eleva a niveles de entre el 93% y el 100%.¹⁸

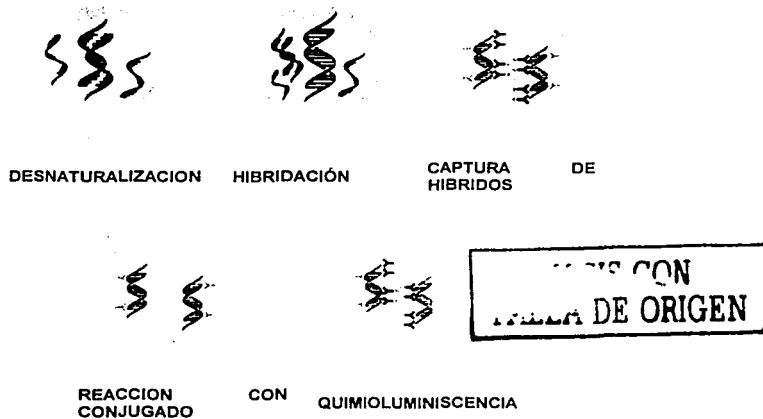


Fig. 22

La muestra del paciente que potencialmente puede contener el DNA viral es desnaturalizada y la cadena liberada de DNA es hibridada en una solución mixta de RNA, que contiene 14 tipos virales; 5 de bajo riesgo (6,11,42,43 y 44) y 9 de alto riesgo (16,18,31,33,35,45,51,52,56).^{18,24}

Los híbridos de RNA-DNA son capturados en la superficie de un tubo que contiene anticuerpos inmovilizados que reconocen específicamente a los híbridos de RNA-DNA. Los híbridos capturados reaccionan con un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina y con un sustrato quimioluminiscente; la luz emitida, es leída por una máquina (luminómetro). El resultado numérico y/o cuantitativo no está sujeto al factor subjetivo del examinador; las medidas se expresan en unidades relativas de luz (relative light units - RLU).^{18,24}

Este examen procesado por la técnica de hibridación molecular, permite la detección de 10 pg/ml de DNA/HPV equivalente a una copia de virus por célula; se considera positivo cuando las relaciones relativas de luz RLU/PCA (controles positivos para virus de bajo riesgo para los virus del Grupo I de (bajo riesgo) y/o RLU/PCB para los virus del grupo II (alto riesgo) son iguales o mayores que uno.^{18,24}

CAPTURA HIBRIDA II – HC II – MICROPLACA.

El laboratorio de investigación de Digene Corporation, bajo la dirección científica de Lőrincz A. quien perfeccionó esta técnica, con una nueva versión mejorada más sensible y específica: Captura Híbrida en Microplaca (HCM). En esta nueva versión, la captura en tubos es reemplazada con una microplaca removible.¹⁸

Este, y varios cambios en la formulación han elevado la sensibilidad analítica de la Captura en Microplaca alrededor de 50 veces sobre la Captura Híbrida en tubos y además agrega la detección de 4 tipos virales de alto riesgo (39,58,59 y 68), con lo cual prácticamente están representados todos los tipos virales

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

oncogénicos. Esta tecnología ha reemplazado a la técnica en tubos que aún continúa siendo válida aunque menos sensible.¹⁸

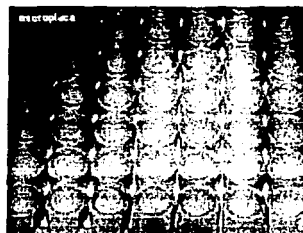
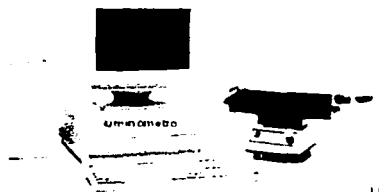
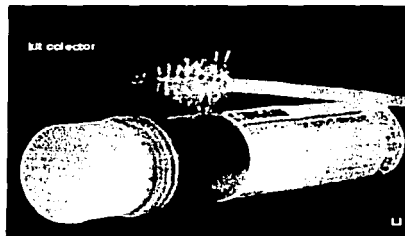


Fig 23

Valores de las relaciones RLU/PCA y/o RLU/PCB menores de 5, indican pequeño número de copias virales por célula, pudiendo significar infección viral latente o en fase de remisión espontánea; en estos casos, a criterio clínico, se sugiere antes de cualquier tratamiento confirmar la presencia de infección activa con nueva

muestra luego de un intervalo de tres meses. La toma de material es una técnica simple y rápida. El material se obtiene por cepillado del área a estudiar y se coloca en un tubo que contiene un medio de conservación y transporte, que retarda el crecimiento bacteriano y preserva la integridad del DNA celular a temperatura ambiente por un máximo de 15 días, tres semanas a -4° o por meses a -20°; el envío al laboratorio, se hace a temperatura ambiente. ^{18, 24}

DETECCIÓN DEL MATERIAL GENÉTICO VÍRICO

La estructura y secuencia genética del genoma representan una característica distintiva fundamental de la familia, tipo y cepa del virus. Se pueden usar sondas de ADN con secuencias complementarias para regiones específicas de un genoma vírico a fin de detectar, cuantificar ácidos nucleicos víricos en muestras clínicas. Las sondas de ADN se pueden usar de modo similar a los anticuerpos como un instrumento sensible y específico para detectar la presencia del virus incluso en ausencia de replicación viral. Éste análisis tiene utilidad especial en las infecciones de virus de replicación lenta o no productivas como es el caso de los papilomavirus.

Las sondas se sintetizan por medios químicos o mediante clonación de fragmentos o un genoma vírico completo en vectores bacterianos (plásmidos). Las copias de ADN de virus ARN se preparan con la transcriptasa reversa de retrovirus y después se clonan. Las sondas son marcadas con nucleótidos radioactivos, éstas permiten detectar secuencias genéticas víricas específicas en biopsias titulares fijas permeabilizadas mediante hibridación in situ. Los ácidos nucleicos víricos presentes en extractos de muestras clínicas se pueden detectar mediante fijación de un pequeño volumen del extracto en un filtro de nitrocelulosa (dot blot o mancha puntiforme), seguido por hibridación del filtro con ADN vírico específico marcado. Como alternativa, el ADN vírico o los productos digeridos con

endonucleasas de restricción del ADN se pueden dividir mediante electroforesis, transferir a un filtro de nitrocelulosa (Southern- Blot: hibridación con sonda ADN-ADN) y después identificar por la movilidad electroforética característica y mediante hibridación con una sonda genética específica. El ARN vírico separado por electroforesis (Nouthern-blot: hibridación con sonda ARN-ADN) se puede transferir a un filtro de nitrocelulosa para detectarlo de modo similar.

IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE VPH

Dos tipos principales de métodos para el diagnóstico de VPH son utilizados y de ellos derivan las técnicas nuevas de identificación viral; la detección del ADN viral y la amplificación HPV-ADN.²³

La hibridación *in situ* y la reacción de cadena de polimerasa han mostrado en lesiones anogenitales su asociación con el VPH 16 y 18. La amplificación del genoma solamente ocurre en en el estrato espinoso de la epidermis y en el granuloso. La expresión del gen *Early* es encontrada en el epitelio y el gen *Late* es encontrado en la infección viral productiva.²⁰

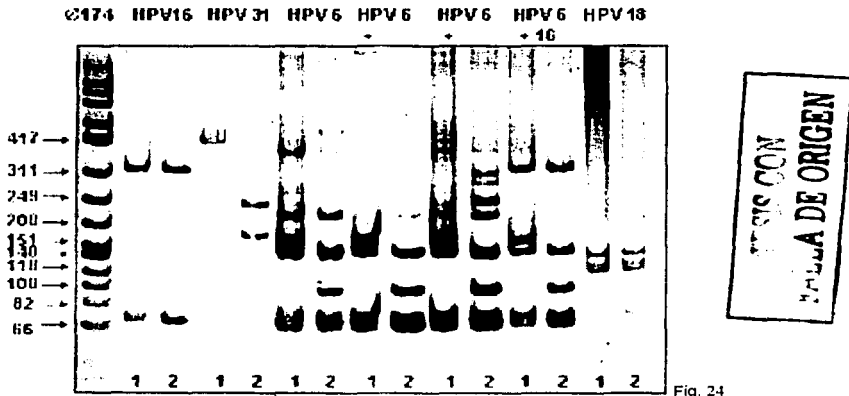
El genoma viral está confinado a los queratinocitos y pueden permanecer en la célula de forma extracromosomal o integrado en el genoma. La persistencia de la infección se asocia en alto grado con la transformación intracelular. El mayor problema en la identificación del VPH en muestras clínicas son el gran número de subtipos y las diferencias entre los genomas de éstos. Los primers son derivados de secuencias conocidas, diseñadas y producidas por amplificación.²⁰

El Southern blot (SB) ; se purifica una cadena de ADN viral mediante enzimas de restricción, son separadas en base al tamaño de los fragmentos por medio de electroforesis. El ADN es transferido a una membrana y se hibrida con una sonda específica de VPH. Mediante ésta técnica se puede distinguir entre el ADN viral episomal y el integrado; esto es importante puesto que el ADN episomal es

encontrado en lesiones benignas y el ADN integrado se detecta en lesiones malignas.²³

El SB es considerado el "estándar de oro" para la detección y tipificación de VPH; es sensitiva a cerca de 1pg de VPH en 10 µg de ADN genómico. Sin embargo la técnica es laboriosa y requiere largas cadenas de ADN de 5-10µg.²³

Reacción de cadena polimerasa (RCP): En la amplificación por RCP con los "primers" se conserva abiertas las cadenas y son seguidas por hibridación con tipos variables de sondas. Ésta tecnología provee una eficacia no alcanzada por otros métodos ya que su sensibilidad alcanza de un 71% a un 86% en la detección del VPH^{20, 23}



Es un método poderoso para generar grandes cantidades de DNA, pero desafortunadamente existe la posibilidad de obtener resultados falsos positivos y requiere considerable experiencia tecnológica. La PCR es comúnmente utilizada en investigación y estudios epidemiológicos para búsqueda ultrasensible de

niveles bajos de DNA en muestras clínicas y para establecer los vínculos de un virus con determinada patología; se espera que en el futuro, con el desarrollo de nuevos kits, esta técnica pueda brindar resultados reproducibles entre distintos laboratorios.^{18, 23}

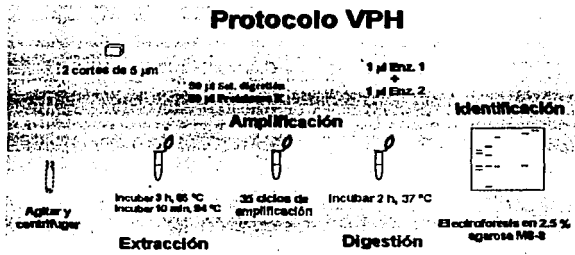


Fig.25

VPH CON FALLA DE ORIGEN

Hibridación *in situ* (HIS): La biología molecular ha realizado avances espectaculares en los últimos años y se ha llegado a la conclusión que la tipificación viral puede cumplir un rol fundamental como método complementario de diagnóstico. El método de hibridación del DNA del HPV que pueda utilizarse de rutina como complemento para la prevención del cáncer cervical, debe ser seguro y reproducible. Este test a su vez, tiene que ser de bajo costo y automatizado.¹⁸

El pretratamiento del tejido consiste en una parcial digestión celular y de proteínas nucleares para poder purificar la cadena de ADN. Esta técnica tiene una sensibilidad de 20-50 genomas por célula. La aplicación de HIS en epitelio morfológicamente normal se utiliza para descartar infección latente del virus.²³

Existen diferentes tests de hibridación para el DNA-HPV. Los pioneros en los estudios clínicos y de investigación en la década del 80 fueron tres tests básicos: Southern Blot (SBH), Dot Blot (DB) e Hibridación in situ (FISH). En la década del 90, adaptaciones semiautomatizadas del PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y reacciones de hibridación en solución, Sistema de Captura Híbrida (HCS), han logrado resultados no menos exactos, pero más rápidos y de menor costo. La amplificación del DNA viral usando PCR, así como la amplificación de señal quimioluminiscente con Captura Híbrida han hecho a los tests más confiables.¹⁸

Las técnicas de hibridación no detectan la presencia del virus como tal, únicamente de su genoma. La detección de tipos específicos de VPH en especímenes tomados de biopsia de piel, con sondas de ADN en la hibridación *in situ* puede proveer una información pronóstica importante para los pacientes.²⁰

Algunos tests, como el Dot Blot (DB) y el Southern Blot (SBH) son de interés histórico para la detección del DNA-HPV en estudios de investigación.¹⁸

VI.-DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN PATOLOGÍA BUCAL

DIAGNÓSTICO DE VPH EN MUCOSA BUCAL

Los diferentes tipos de papilomavirus humanos juegan un papel importante en varias enfermedades, particularmente en diversos procesos proliferativos de células epiteliales de cabeza y cuello 1-2 . Hay una clara asociación entre el papilomavirus y el tejido epitelial, en las displasias y lesiones neoplásicas de varios tejidos en humanos(incluso en otros mamíferos)²⁹

Éstos virus han sido implicados en la etiología de lesiones premalignas y neoplasias malignas incluyendo aquéllas que involucran la mucosa bucal.²⁶

De acuerdo a los genotipos observados, éstos virus se han clasificado dentro de tres grupos de riesgo, dependiendo el potencial de desarrollar fenotipos de malignidad; el grupo de alto riesgo(tipos 16, 18, 45 y 56) , riesgo medio (tipos 31, 33, 35, 51, 52 y 58) y bajo riesgo (tipos 6, 11, 42, 43 y 44). Actualmente, del VPH han sido reportados e incluidos 70 subtipos severos de éste, más de 12 han sido identificados en lesiones bucales.³¹

Los tipos; 1, 2, 4, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 30, 32 y 57 han sido implicados en la etiología de lesiones de células escamosas bucales.^{26, 31} En lesiones bucales se han identificado antígenos del virus del papiloma humano (VPH) en lesiones benignas, premalignas y malignas de cavidad bucal, incluyendo; papilomas de células escamosas, condiloma acuminado, hiperplasia epitelial focal, verruga vulgar, liquen plano, leucoplasias, queratosis nicotínica, queratoquistes odontogénico, ameloblastoma, displasia epitelial y carcinoma de células escamosas³¹

Más de 60 subtipos de VPH han estado identificados como agentes infecciosos asociados a cáncer; están considerados como virus persistentes que residen en las células de forma latente. Se caracterizan por tener un bajo grado de

patogenicidad pero los efectos sinérgicos con otros carcinógenos como lo es el tabaco y el alcohol puede exacerbar su potencial carcinogénico, se han encontrado evidencias del papel carcinogénico que juega el VPH en éste tipo de lesiones; en un estudio realizado en la Universidad de Carolina (USA) se concluyó que aproximadamente el 60 % de los casos estudiados de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello incluyendo piso de boca, lengua, faringe y laringe fueron positivos al ADN del VPH tipo 6, 11, 16 y 18. ²⁸

En la actualidad, se han definido los tipos 16 y 18 como seguros carcinógenos humanos y los tipos 31 y 33 como de alta probabilidad carcinogénica. Siendo el 16 el más común de los tipos asociado con carcinomas de tejido bucal y genital.³¹ En la displasia epitelial y en el carcinoma de células escamosas han sido demostradas secuencias de ADN de VPH, en éstas lesiones el VPH-16 fue el tipo más identificado. ^{28,29}

También se detectó en 6 de 10 casos de muestras de mucosa bucal por Adler-Storthz. Reportes de Lawton (1992), determinaron VPH en un 60 % de las muestras recolectadas en 60 individuos: en éste estudio, el genotipo de VPH 16 fue también el más encontrado. Algunos tipos virales han sido identificados en leucoplasias y liquen plano con rangos potenciales en la progresión maligna. ^{27,31}

De 41 casos estudiados en el INOR de Cuba, 29 de lesiones premalignas, malignas e incluso tejido normal de cavidad bucal fueron positivos a por lo menos un tipo de VPH, a pesar del número reducido de casos fue sorprendente la alta prevalencia a la infección en tejido bucal tanto patológico como normal: el mayor porcentaje lo ocuparon las eritroplasias, seguido de las leucoplasias, de los carcinomas y con un 70% de los casos normales presentaron infección por VPH siendo el tipo 16 el más frecuente en todos los casos excepto en las eritroplasias en las que prevaleció el tipo 6. ²⁶

Se han identificado a los VPH predominantemente los tipos 2,11,16 y 18 en carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, mas específicamente en

carcinomas bucales localizados en mucosa bucal , lengua y piso de boca por técnicas de hibridación²⁷.

Se reconoce que dos tipos de virus del papiloma humano VPH-16 Y VPH-18, asociados a procesos benignos y malignos del tracto genital , originan hasta 95% del cáncer cervicouterino, se ha determinado que tales virus podrían relacionarse también con diferentes tipos de cáncer bucal.^{26, 30}

Estos virus especialmente variantes del 16 pueden asociarse con infecciones bucales, análogamente a lo encontrado en cérvix uterino. Estudios epidemiológicos indican el potencial del agente infeccioso como etiología de carcinoma bucal; en epitelio cervical y bucal los queratinocitos sufren inmortalización y transformación por el VPH 16 " *in vitro*" debido al gen E6 del VPH que ha sido reportado como culpable de la transformación e inmortalización de los queratinocitos " *in vitro*", por lo que éste virus aparece como uno de los agentes etiológicos más importantes involucrados en el desarrollo de lesiones premalignas y malignas del epitelio.^{27, 31} Los tipos genéticos del VPH 6 y 11 encontrados en lesiones genitales benignas así como los tipos 16 y 18 de lesiones genitales malignas reflejan las similitudes citológicas entre mucosa genital y bucal.²⁷

Aunque el papel del VPH en la neoplasia epitelial del tracto genital femenino ha sido investigado intensamente, el potencial del virus como factor carcinogénico en lesiones neoplásicas de mucosa bucal permanece aún en especulaciones. El papilomavirus humano juega un papel importante en el desarrollo de neoplasias y ha sido detectado con diferentes técnicas en lesiones anogenitales y en pacientes con carcinoma cervicouterino.³¹

Se ha informado que la alta incidencia de infección por VPH encontrada en cavidad bucal y el aumento de cáncer en la misma puede estar relacionado con el incremento en las enfermedades de transmisión sexual . Así mismo, la infección

podiera estar condicionada a la transmisión debido a instrumentos dentales o por el uso común de utensilios de comer.²⁶

La alta frecuencia encontrada también puede reflejar la incidencia de tabaquismo en estos pacientes que puede ser predisponente para la infección de VPH; se encontró un alto porcentaje de positividad de VPH en carcinomas bucales de pacientes con hábito de mascar tabaco y/o nuez de betel²⁷.

Se ha demostrado que el VPH 16 está presente en pacientes con carcinomas bucales en comparación con grupos control de pacientes sanos; en éste estudio se encontró un índice de infección de VPH 16 entre los pacientes del 30.8 % en lesiones de cáncer bucal y un 26.9 % en los sitios no afectados del mismo paciente positivos al VPH. Éstos resultados indican que no se ha visto una diferencia significativa en lesiones de cáncer comparadas con grupos control sanos.³¹

Equiparando diversos sitios de la cavidad bucal; no se encontró correlación significativa entre la infección con el virus y algún sitio específico de mucosa bucal, esto sugiere que la aparición del VPH no siempre es muy evidente. Reportes de la prevalencia del VPH en pacientes con carcinoma bucal varían de un 0% a un 100%, ésta variabilidad se relaciona con el tamaño de la muestra y la sensibilidad de la técnica aplicada.³¹

La evaluación por citología exfoliativa es la técnica más importante en el diagnóstico de lesiones genitales, la ventaja de la citología exfoliativa bucal en la detección viral ha sido previamente descrita; éste procedimiento no invasivo, es comparable con la obtención de tejido por medio de biopsia para la evaluación de células epiteliales, estudiaron por medio de células exfoliadas de cavidad bucal en adultos sanos y niños preescolares la existencia de VPH 6 y 16 por medio de PCR. En adultos los tipos 6 y 16 estuvieron presentes en las muestras en un 17 % y 23 % respectivamente; los resultados en niños preescolares fue de 24% y 19 % respectivamente, esto demuestra que el ADN del VPH se presenta en un alto porcentaje en el tejido epitelial normal³¹

El diagnóstico tradicional de VPH depende de la citología cervical por Papanicolaou (Pap). En la actualidad para demostrar la presencia del virus, además de la citología se dispone de las técnicas de biología molecular. El Southern blott es la técnica molecular más utilizada, es de alta sensibilidad pero requiere de mucho tiempo y necesita tejido fresco. La técnica más sensible para detectar VPH es PCR (Reacción de Polimerasa en Cadena), sin embargo por la sensibilidad tan alta tiene rango elevado de contaminación y puede dar falsos positivos; ambas técnicas no están autorizadas por la FDA . La prueba más adecuada para fines clínicos en la detección del VPH es la Captura de Híbridos (SCH): el estudio es tan sensible como el Souther blott y tan sencillo como un inmunoensayo . Cuando se compara con la histología muestra una sensibilidad del 86%, especificidad del 77% y valor predictivo positivo del 87%.³²

El SCH detecta cantidades muy pequeñas de ADN de VPH que no ha producido cambios celulares capaces de ser discriminados por el ojo humano a través de la microscopía. La prueba permite identificar los virus de alto riesgo oncogénico con una sensibilidad del 100%.³²

CONCLUSIONES

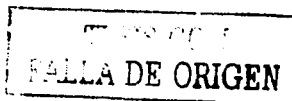
La infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo se asocia con cambios celulares de tipo neoplásico debido a la interacción de su genoma con la célula hospedera. El virus requiere de células diferenciadas para su replicación, debido al tropismo epitelial que desarrolla, el VPH infecta los queratinocitos, induciendo en ellos la proliferación epitelial desenfrenada; ocasionando una neoplasia intraepitelial que al paso del tiempo progresa a carcinoma in situ e invasivo en cualquier epitelio, incluyendo mucosa bucal.

Debido a esto la identificación del genoma viral intracelular cobra especial importancia en el diagnóstico y tipificación viral de las células. Existen varios métodos disponibles y en general están basados en una reacción de hibridación que consiste en el acoplamiento o unión de una banda de ácido nucleico con el DNA complementario en la muestra a examinar para formar una dupla estable.³⁵

El Southern Blot es considerado el patrón de oro para la identificación del VPH en células exfoliadas o biopsia de tejidos. La Hibridación In Situ (HIS) se realiza sobre tejido previamente tratado enzimáticamente y físicamente; es poco sensible, sólo detecta infecciones productivas y no puede revelar el tipo de DNA presente, pero tiene la ventaja de indicar la localización de las células o las regiones infectadas en el tejido²⁷ Una de las técnicas más sensibles y actualmente disponible, es la reacción en cadena de polimerasa (PCR), que tiene la ventaja de detectar cantidades mínimas de DNA viral, la mayor ventaja del PCR es su sensibilidad, lo que también es su mayor desventaja ya que presenta una alta susceptibilidad a la contaminación cruzada y ocasionalmente produce resultados falsos positivos.

Otro método actualmente utilizado es la Captura de Hibridos; este método puede identificar hasta 16 tipos diferentes de VPH, es muy específico y no presenta problemas de contaminación cruzada³⁵, por lo que se propone como una técnica molecular aplicable a la identificación viral en boca como parte del nuevo vínculo entre la patología bucal y el diagnóstico molecular.

REFERENCIAS



- 1) Herrera H, Restrepo P. El virus del papiloma humano y su relación con la neoplasia cervical humana. Dpto. Patología Univesidad Javeriana
<http://www.javeriana.edu.co/facultades/ciencias>
- 2) Rocha Zavaleta .VPH y cáncer cervicouterino. Dpto. biolog{ia Molecular y Biotecnología. Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM
<http://www.biomédicas.UNAM.mx/html/bmyl/rocha/rocha>
- 3) Kohen B. Metodología diagnóstica en la patología del tracto genital inferior.
<http://galeon.com/drmarin/metodologia.htm>
- 4) Weissenbacher E, Scheinelder A, Gissmann G Directrices para el diagnóstico y el tratamiento de las infecciones genitales femeninas por el VPH. Sociedad Alemana de Obsireticia y Ginecología www.cervical-cancer.de/HPV/spanisch.html
- 7) Alonso P, Lazcano Hernández. Cáncer Cervicouterino; Diagnóstico, Prevención y control. Interameicana;2001
- 8) Puertas . Genética Fundamental y Perspectiva. Interamericana;1992
- 9) Murray P. Microbiología Médica. Harcourt Brace; 1997
- 10) Alcamo Edward Wm C Brown DNA Technology . The Awesome Skill Publisher 1996
- 11) World Health Organization. Human Papillomavirus WHO;1995
- 12) Singer Genes y Genomas Omega, 1993
- 13) Jay A Levy Virology Prentice Hall : 1988
- 14) Cox T Biología molecular en Medicina. Panamericana;1998
- 15) Negroni M. Microbiología Estomatologica. Fundamentos y guía práctica. Médica Panamericana,1999
- 16) Youmans G.P. Peterson P. Sommers H. M. Manual de Infectología Tomo I. Interamericana Mc Graw Hill :1982
- 17) Lodish H, Berk A, Lawrence S,Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Biología Celular y Molecular Médica Panamericana,2003
- 18) Illescas Lucrecia Captura Híbrida. Generalidades técnica interpretación y manejo de resultados. Octubre 2002[en línea] 02- noviembre 2002[fecha de acceso] www.gineconet.com
- 19) A Dangler Charles Nucleic Acid Análisis, Principles and Bioapplications. Wily-Liss 1996

- 20) Stephenson J. Diagnostic Virology Protocols Chapter 8 Stephenson-Warnes 1998
- 21) Molecular Methods for Virus Detection. Wiedbaruk D, Farkas D Academic Press N.Y; 1994
- 22) Rickwood D. Hames B. Medical Virology A practical Approach Desselberg; 1995
- 23) Human Papillomaviruses and Cervical Cancer, biology and immunology. Stern P, Stanley M. Oxford Medical Publications; 1994
- 24) García Carrancá. Oncogenes y cáncer. 2º. Curso Temás Selectos de Genética Humana; 7 al 11 abril 2003. Hospital Juárez de México. Sociedad de Cirugía. Dirección de Investigación y Enseñanza.
- 25) Illescas L.T, Lorincz A, Shere C, Laudi R, Dino D. Captura Híbrida como método de screening en países en desarrollo. Buenos Aires; 2002 www.gineconet.com
- 26) Ramírez. Detección de ADN de Papilomavirus Humano en lesiones orales y en tejido normal. *Cancerología* 1993 39(2) pp. 1820-1824
- 27) Walls. Brewer. Fry. Human papillomavirus DNA types in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oral Surg Oral Med, Oral Pathol* June 1991 71 (6) pp. 701-706
- 28) Shroyer, Greer. Detection of human papillomavirus DNA by in situ DNA hybridization and polymerase chain reaction in premalignant and malignant oral lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* June 1991 71(6) pp 708-712
- 29) Almadori, Galli. HPV and CCND1 in Laryngeal SCC Head & Neck June 2002 24 : pp 597-604
- 30) Centro Oncológico del Hospital Johns Hopkins www. Johnshopskin.com
- 31) Mao, Seattle. Wash. Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelia *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80 pp320-9
- 32) Zamora Palma, Terrés Speziale. Infección por el virus del papiloma humano en mujeres y hombres mexicanos. Identificación por el sistema de captura de híbridos *Revista Mexicana de Patología Clínica* Vol. 45 Numero 1 Enero-Marzo 1998
- 33) Xuan Liu- No Hee Park. HPV oncogenes E6 and E7 are mutagenic in normal human oral keratinocytes *Oncogene* 1997 (14) 2347-2553
- 34) Epidemiología descriptiva del cáncer de cavidad bucal en el Instituto de Cancerología (1985-1992) *Cancerología* Vol 43 Num 2 Abril-Junio 1997 80-85pp
- 35) Herrera H, Restrepo P. El Virus Del Papiloma Humano y su relación con la neoplasia cervical humana. Departamento de Patología Pontificia Universidad Javeriana, 1997
- 36) Mc Donal D. Cytogenetic Information Site. Cytogenetics Laboratory, Seattle U.S.A 2002

GLOSARIO

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ácido desoxirribonucleico; Largo polímero compuesto por cuatro tipos de nucleótidos de desoxirribosa que contiene información genética.

ADNc ; Molécula de ADN copiada de una molécula de ARNm mediante la transcriptasa reversa por lo que carece de los intrones del ADN genómico

Alcali; Sustancia de pH extremadamente básico

Atemperar; Llevar a la temperatura ambiente

Bicatenario; Constituido por dos cadenas

Blot; Membrana

Cápside; Cubierta proteica externa de un virus formada por autoensamblaje de subunidades proteicas

Carcinogénico; Cualquier agente físico o químico capaz de producir cáncer cuando las células se exponen a ellos.

Cebador; Corta secuencia de ácido nucleico que contiene un grupo hidroxilo 3' que forma pares de bases con una hebra de patrón complementaria y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos.

centrifugación

Citoquinas; Cualquiera de las numerosas proteínas secretadas por los interferones y que se unen a receptores celulares específicos para inducir su diferenciación o proliferación.

Codificar; Determinar los tripletes de nucleótidos (codones)

Coilocitosis; Aspecto histológico de la célula con inclusiones víricas en su núcleo.

Daltons. Unidad de medida para designar peso atómico

Desnaturalización; Alteración drástica de la conformación de una proteína o un ácido nucleico debido a la ruptura de diversos enlaces covalentes como consecuencia del calentamiento o exposición a agentes químicos determinados.

Electroforesis; Cualquiera de varias técnicas para la separación de macromoléculas basadas en la migración sobre un gel u otro medio sometido a un fuerte campo eléctrico.

Endocitosis; Captación del material extracelular por invaginación de la membrana plasmática para formar una vesícula limitada por una membrana.

Endonucleasas; Enzimas nucleares

Ensamblaje; Proceso de extracción de intrones y la incorporación de exones.

Episomal, ADN fuera del núcleo.

Epiteliotrópicos; Afinidad por el epitelio

TECIS CON FALLA DE ORIGEN

Episomal; ADN fuera del núcleo.

Epiteliotrópicos; Afinidad por el epitelio

Eucariotas; Clase de organismos compuestas por una o más células que contienen un núcleo, organelos cubiertos por una membrana.

Exacerbar; Incrementar reacción

Exocitosis; Liberación de moléculas intracelulares contenidas dentro de una vesícula.

Extracromosoma; Fuera del cromosoma

FDA; Federal Drugs Administration

Fenotípicas; Características físicas genéticamente determinadas.

Gen; Unidad física y funcional de la herencia que transporta información de una generación a la próxima.

Genoma; Total de la información genética contenida en una célula o un organismo.

Genotipos; Constitución genética completa de una célula u organismo aislado; también los alelos de uno

Heterodúplex; Molécula bicatenaria de ADN que contiene uno o más pares de bases mal apareadas.

Intron; Parte de una transcripción primaria o el ADN que lo codifica que se elimina por empalme durante el procesamiento de ARN y no se incluye en los ARNm, ARNt.

Kilobases; Unidad de medida para designar codones

Luminómetro; Aparato que mide la intensidad de la luz

Monómeros; Cualquier molécula pequeña que se puede unir con otras del mismo tipo para formar polímeros.

Nouthern-blotting; Técnica utilizada para detectar ARN específica separados por electroforesis por hibridación con una sonda de ADN marcada radioactiva.

Nucleocápside; Cápside viral más el ácido nucleico que encierra.

Plásmido; Pequeña molécula circular de ADN extracromosomal capaz de inducir la replicación autónoma de una célula.

Renaturalización o hibridación in situ es detectar éste enlace se utilizan sustancias marcadoras en las

Sondas; Fragmento definido de ARN y ADN con marca radioactiva o química utilizada para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos marcados

Southern blotting; Técnica para detectar secuencias de ADN específicas separadas por electroforesis mediante hibridación con una sonda de ácidos nucleicos marcados.

Taq polimerasa ; ADNasa

Test; Técnica diagnóstica

T_m ; intervalo de temperatura en el que ocurre la desnaturalización

ultracentrífuga; aparato que puede determinar el coeficiente de sedimentación expresado en unidades de Svedberg (S)

Unidades Svedberg ;guarda relación con el peso molecular de la partícula²

virión