



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

VALIDACION MOLECULAR DEL DIAGNOSTICO COLPOSCOPICO DE LA INFECCION POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA DE LOS ANGELES LIRA DE LA CRUZ



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Envío a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el resultado de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Ma. de los Angeles Lira de la Cruz

FECHA: Febrero 13, 2004

FIRMA: Angela Lira

México, D.,F., a 9 de febrero de 2004.

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

**"Validación molecular del diagnóstico colposcópico
de la infección por virus del papiloma humano"**

realizado por **la Srita: P. de B. Maria de los Ángeles Lira de la Cruz,**

con número de cuenta **8625020-9** , quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario **Dra. Leticia Rocha Zavaleta**

Propietario **Dr. Fernando Cruz Talonia**

Propietario **Dr. Jorge Evaristo Alejandro Cruz**

Suplente **M. En C. Emilio Joaquín Córdova Alarcón**

Suplente **Biólogo Alfredo Alejandro Martínez Peñaloza**

Consejo Departamental de **Biología**

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

El presente
trabajo se realizó en
el laboratorio de la Doctora
Leticia Rocha Zavaleta del Departamento
de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones
Biomédicas (IIB) de la Universidad Nacional Autónoma
de México (UNAM), con el apoyo económico prestado
por el Sistema Nacional de Investigadores (SIN) a
través de la beca de Ayudante de Investigador
otorgada por el Dr. Carlos Larralde
Rangel del Departamento de
Inmunología del mismo
Instituto.

Dedicatoria

A Francisca e Ismael, por darme la vida.

**A Lino Daniel, que me dio el empuje necesario
para ser una gran triunfadora.**

**A Dios por brindarme una segunda
oportunidad de vivir.**

**A todas esas mujeres que luchan día a día contra
el cáncer de cérvix en México con la firme
esperanza de que en un futuro cercano
la ciencia descubra al fin la forma
de detener esta enfermedad.**

**Como un homenaje póstumo a todas esas mujeres
que han muerto por esta enfermedad, mi
eterna gratitud por haber despertado
mi conciencia para luchar contra
este grave problema.**

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Fernando Cruz Talonia, Director de la Clínica de Displasias de Hospital General de México S.C. por el apoyo a este proyecto y las facilidades otorgadas en la recolección de las muestras de tejido cervical.

Al Dr. Víctor Manuel Valdespino Gómez, por su ayuda para la realización de las capturas de híbridos. Al Dr. Jorge Evaristo Alejandro Cruz, porque más que un maestro se ha convertido en un extraordinario guía y amigo. A mi directora de tesis, Dra. Leticia Rocha Zavaleta, por su excelente guía e infinita paciencia.

A Ramón Aureliano, porque en más de una ocasión me tendió la mano, cuando más necesitaba de un hermano mayor a quien seguir como ejemplo.

A Gume Sánchez, Brany Contreras, Lety Gómez, Manuelito Álvarez y Angie Mijangos, por brindarme el apoyo, la atención, la amistad y el cariño de los verdaderos amigos.

Y por último, a las personas que nunca creyeron en mí, pues con ello me lanzaron el reto que me dio la fortaleza y el coraje necesarios para seguir adelante.

I. CONTENIDO

Reconocimiento.....	2
Dedicatoria.....	3
Agradecimientos.....	4
I. Contenido.....	5
A. Abreviaciones.....	9
B. Índice de figuras.....	12
C. Índice de tablas.....	13
D. Índice de gráficas.....	14
II. RESUMEN.....	15
III. INTRODUCCIÓN.....	16
A. Epidemiología del cáncer cervical.....	16
1. El caso de México.....	18
B. Métodos de diagnóstico del cáncer cervical.....	20
1. Citología exfoliativa del cuello uterino.....	21
2. Histopatología cervical.....	22
3. Colposcopia.....	23
4. Diagnóstico molecular.....	26
a. Pruebas enfocadas a la detección de DNA viral.....	26

- PCR (Polymerase Chain Reaction).....	26
- Captura de Híbridos.....	28
b. Pruebas enfocadas a la detección de proteínas virales..	29
C. Factores de riesgo asociados al cáncer cervical.....	29
1. Ginecológicos y de conducta.....	29
2. Sociodemográficos.....	31
3. Tabaquismo.....	34
4. Anticonceptivos orales.....	32
5. Inmunológicos.....	32
6. Dietéticos.....	32
7. Agentes infecciosos.....	33
D. Anatomía del aparato reproductor femenino.....	33
1. Cérvix normal.....	34
2. Historia natural del cáncer cervical.....	36
a. Infección por virus del papiloma humano.....	36
b. Neoplasia intraepitelial cervical.....	37
c. Carcinoma cervical.....	39
F. Virus del Papiloma Humano (VPH).....	40
1. Organización genómica.....	43
a. Región larga de control (LCR).....	44
b. Región temprana (E).....	45
- E1.....	46
- E2.....	47
- E4.....	49
- E5.....	49
- E6.....	50
- E7.....	51
c. Región tardía (L).....	52
- L1.....	52
- L2.....	53

IV. JUSTIFICACIÓN.....	54
V. OBJETIVOS.....	55
VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....	56
A. Material humano.....	56
B. Colposcopia.....	56
C. Digestión del tejido cervical.....	57
D. Extracción y purificación de DNA.....	57
1. Extracción de DNA.....	57
2. Purificación de DNA.....	58
E. Cuantificación de DNA.....	59
F. PCR (<i>Polymerase chain reaction</i> ; reacción en cadena de la polimerasa).....	60
1. Determinación de la integridad del DNA: PCR β -globina humana.....	61
2. Determinación de la presencia de DNA de VPH.....	62
a. PCR-Gp 5/6.....	62
b. PCR-My 09/11.....	63
3. Amplificación de secuencias específicas de la LCR de VPH-16.....	64
4. Determinación de la presencia e integridad del gen E2 de VPH-16.....	64
G. Electroforesis en geles de agarosa.....	65
H. Captura de híbridos.....	67
I. Seguimiento clínico de pacientes.....	68
1. Diagnóstico histopatológico.....	68
2. Postratamiento.....	68
J. Esquema de actividades.....	70
VII. RESULTADOS.....	71
A. Diagnóstico clínico: Colposcopia.....	71

B. Epidemiología.....	71
C. Diagnóstico molecular.....	76
1. PCR general	76
a. PCR- β globina humana.....	76
b. PCR-Gp 5/6.....	77
c. PCR-My 09/11.....	79
2. Captura de híbridos.....	80
3. PCR tipoespecífica.....	82
a. PCR-LCR VPH-16.....	82
b. PCR-E2 VPH-16.....	83
D. Diagnóstico histopatológico.....	84
E. Seguimiento clínico.....	86
VIII. DISCUSIÓN.....	87
IX. CONCLUSIONES.....	94
X. BIBLIOGRAFÍA.....	95
XI. GLOSARIO.....	127
XII. PROTOCOLOS.....	129

A. Abreviaciones

A Adenina.

ATP Adenosina trifosfatada.

ATPasa Enzima catalítica específica para ATP.

B16F0 Células de origen murino, cuyo proceso de malignización no está asociado a VPH.

BPV-1 virus del papiloma bovino de tipo 1 (del inglés: bovine papillomavirus type 1).

Bx Biopsia.

C Citosina.

°C Grado Centígrado ó Celsius.

CaCe Carcinoma cervical.

Cdk's Ciclinas dependiente de cinasas (de sus siglas en inglés: cyclin-dependent kinases).

CENACLID Centro Nacional de Clínicas de Displasias.

CMVH Citomegalovirus humano.

CO₂ Dióxido de carbono.

D.O. Densidad óptica.

DNA Ácido desoxirribonucleico (de sus siglas en inglés: *deoxirribonucleic acid*).

dNTP's Dinucleótidos trifosfatados.

DOC Programa de Detección Oportuna del Cáncer.

E Temprano (del inglés: *early*).

E2BS Sitio de unión a la proteína E2 (del inglés: *E2 binding site*).

E6AP Proteína asociada a E6 (del inglés: *E6 associate protein*).

ETS's Enfermedades de transmisión sexual.

G Guanina.

G₀ Gap 0 del ciclo celular.

G₁ Gap 1 del ciclo celular

G₂ Gap 2 del ciclo celular.

Gp Oligonucleótidos generales (del inglés: general primers).

H₂Od Agua destilada.

IARC Asociación Internacional para la Investigación del Cáncer (de sus siglas en inglés: *International Association for Research of the Cancer*).

Kd Kilodaltones.

KRF Factor de transcripción específico de queratinocitos.

L Tardío (del inglés: *late*).

LCR Región larga de control (del inglés: *long control region*).

LEEP Asa diatérmica (del inglés: *loop electrosurgical excision procedure*; procedimiento de extirpación con asa electroquirúrgica).

M Mitosis.

MgCl₂ Cloruro de Magnesio.

μl Microlitro.

mM Milimolar. La milésima parte de un mol (M^{-3}).

Pap test Estudio de citología exfoliativa cervical, conocido comúnmente con el nombre de Papanicolaou (abreviación en inglés: Papanicolaou-Trout Test).

pb Pares de bases.

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (de sus siglas en inglés: *Polymerase Chain Reaction*).

PM Peso molecular.

pM Picomolar. La millonésima parte de un mol (M^{-9}).

pRB Proteína del retinoblastoma.

r.p.m. Revoluciones por minuto.

SiHa Células epiteliales de carcinoma escamoso cervical establecida de fragmentos de tejido primario obtenido por cirugía de una paciente japonesa de 57 años. La microscopía electrónica revela presencia de desmosomas atípicos en las uniones celulares y gran abundancia de tonofilamentos en el citoplasma. Esta línea celular humana contiene una o dos copias del genoma de VPH de tipo 16 integrado al genoma celular, el cual presenta mutados los genes pRB y p53.

T Timina.

TBE Buffer Tris Borato EDTA.

TBP Proteína de unión a la caja TATA (del inglés: *TATA box binding protein*).

TE Buffer Tris-HCl EDTA.

TM Temperatura optima de alineamiento de un oligonucleótido al DNA blanco (del inglés, *temperature melting*).

URR Región reguladora río arriba (del inglés: *upstream regulatory region*).
También llamada LCR.

UV Luz ultravioleta.

VHC-2 Virus del herpes genital tipo 2.

VPH Virus del papiloma humano.

B. Índice de figuras.

- Figura 1.** Tasas de incidencia del cáncer cervical a nivel mundial en 1995.
- Figura 2.** Tasa de mortalidad estatal por cáncer cervical en México de 1980 a 1990.
- Figura 3.** Citología cervical exfoliativa: toma de muestra y su estudio microscópico.
- Figura 4.** Toma de biopsia dirigida para el estudio histopatológico del cérvix uterino.
- Figura 5.** Inspección de pacientes durante la consulta colposcópica.
- Figura 6.** Observación colposcópica del cérvix uterino tras aplicar ácido acético.
- Figura 7.** Diagrama de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Figura 8.** Dibujo esquemático del proceso molecular de Captura de Híbridos.
- Figura 9.** Factores de riesgo secundario asociados al cáncer cervicouterino.
- Figura 10.** Dibujo esquemático de la ubicación del cerviz uterino humano.
- Figura 11.** Organización celular y estructural de los epitelios del cérvix uterino.
- Figura 12.** Infección por virus del papiloma humano: observación colposcópica.
- Figura 13.** Neoplasia intraepitelial cervical (NIC): observación colposcópica.
- Figura 14.** Carcinoma cervical: observación colposcópica de la lesión en el cérvix.
- Figura 15.** Micrografía electrónica del Virus del Papiloma Humano.
- Figura 16.** Organización genómica de lo Virus del Papiloma Humano (VPH).
- Figura 17.** Representación esquemática de la electroforesis en geles de agarosa.
- Figura 18.** Amplificación de un segmento del gen de la β -globina humana.
- Figura 19.** Amplificación de un segmento del gen L1 de VPH mediante Gp 5/6.
- Figura 20.** Amplificación de un segmento del gen del gen L1 de VPH mediante My09/11.
- Figura 21.** Amplificación tipo específica de un segmento de la LCR del VPH-16.
- Figura 22.** Amplificación por PCR del gen E2 de VPH-16 de biopsias cervicales.

B. Índice de tablas

- Tabla 1.** Características estructurales y funcionales de las proteínas de los VPH.
- Tabla 2.** Composición de la mezcla de reacción de PCR.
- Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones por PCR.
- Tabla 4.** Temperaturas de reacción para la amplificaciones por PCR.
- Tabla 5.** Factores de riesgo de desarrollo del cáncer cervical (datos de entrevista).
- Tabla 6.** Factores de riesgo de desarrollo del cáncer cervical (datos de entrevista).
- Tabla 7.** Integridad del DNA obtenido de biopsias cervicales dirigidas colposcópicamente.
- Tabla 8.** Detección por PCR del gen L1 de VPH mediante PCR Gp5/6.
- Tabla 9.** Detección por PCR del gen L1 de VPH mediante PCR My 09/11.
- Tabla 10.** Detección de DNA de VPH : PCR Gp5/6 versus PCR My 09/11.
- Tabla 11.** Detección molecular de DNA de VPH mediante Captura de Híbridos.
- Tabla 12.** Determinación de la presencia de DNA de VPH en la población estudiada.
- Tabla 13.** Detección por PCR de un segmento de la LCR del VPH-16.
- Tabla 14.** Detección por PCR tipoespecífica del gen E2 de VPH-16.
- Tabla 15.** Diagnóstico histopatológico de las biopsias dirigidas por Colposcopia.
- Tabla 16.** Seguimiento clínico del tratamiento colposcópico en las pacientes

C. Índice de gráficas

- Gráfica 1.** Tasa de mortalidad por cáncer cervical en México de 1980 a 1990.
- Gráfica 2.** Distribución de edad de las pacientes incluidas en este estudio.
- Gráfica 3.** Factores de riesgo de desarrollo de CaCe: edad al iniciar vida sexual.
- Gráfica 4.** Factores de riesgo de desarrollo de CaCe: multiparidad.
- Gráfica 5.** Factores de riesgo de desarrollo de CaCe: tabaquismo.
- Gráfica 6.** Tabaquismo en función del diagnóstico colposcópico.
- Gráfica 7.** Factores de riesgo de desarrollo de CaCe: Anticonceptivos orales.
- Gráfica 8.** Uso de anticonceptivos orales en función del diagnóstico colposcópico.
- Gráfica 9.** Diagnóstico comparado de las biopsias cervicales de la población de estudio.

II. RESUMEN

Entre las muchas enfermedades que aquejan a los seres humanos, el cáncer cervicouterino, es el segundo cáncer femenino más común a escala mundial. En México, este problema ha alcanzado tal importancia que se le considera un problema de salud pública, el cual, a pesar de que existe un programa de monitoreo cervical desde 1974, no se ha registrado disminución en la tasa de mortalidad nacional por cáncer cervicouterino. Esta neoplasia causó en 1980 la muerte de 2522 mujeres, en 1990, 4250; y, de acuerdo con datos revelados por la Secretaría de Salud, se sabe que en la actualidad, mueren un promedio de 1.5 mujeres cada 2 horas, es decir, 6570 muertes anuales.

La Colposcopia, es una de las técnicas más recientemente considerada dentro de los programas de detección de cáncer en poblaciones abiertas y que nos brinda la posibilidad de detectar un amplio número de lesiones precursoras de cáncer cervicouterino, lo que los métodos tradicionales no han podido lograr. En este trabajo se evalúa la eficiencia de este método en 100 pacientes a las que se les practicó biopsia dirigida por Colposcopia, diagnosticándose: 71 como Infección por Virus del Papiloma Humano, 24 Neoplasia Intraepitelial Cervical y 5 Cáncer Cervical; a las que a través de métodos moleculares como PCR (93%) y Captura de Híbridos (96%), se descubre que el diagnóstico colposcópico, si determina la presencia de lesiones asociadas a la presencia de VPH. El seguimiento postratamiento y el estudio histopatológico de las biopsias de las pacientes, revelan la eficiencia del diagnóstico colposcópico en 64% de los casos estudiadas y el éxito del tratamiento ofrece un 68% de probabilidades de quedar libre de lesiones a 96 meses. Se puede concluir que la Colposcopia es un método de diagnóstico confiable y rápido para detectar lesiones malignas y premalignas de CaCe.

III. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia, la salud ha estado estrechamente relacionada con la existencia y el crecimiento de la humanidad. En cuanto a la salud, se reconoce que ella depende tanto del estilo de vida de las personas como del ambiente que las rodea; por lo tanto, la forma en que se enfrentan a las enfermedades en los distintos países del planeta es el resultado directo de las complejas interacciones culturales, económicas y políticas que imperan en ellos. Entre las muchas enfermedades que aquejan a los seres humanos desde su aparición sobre la faz de la Tierra, el cáncer es una enfermedad que en cualquiera de sus formas, ataca a cualquier persona sin distinción de raza, credo o posición social (Magrath y Litvak, 1993). Existen muchos tipos de cáncer reconocidos hoy en día, pero uno de ellos, el cáncer cervicouterino (CaCe), es el segundo cáncer femenino más común a escala mundial (Parkin, 1992).

A. Epidemiología del cáncer cervical

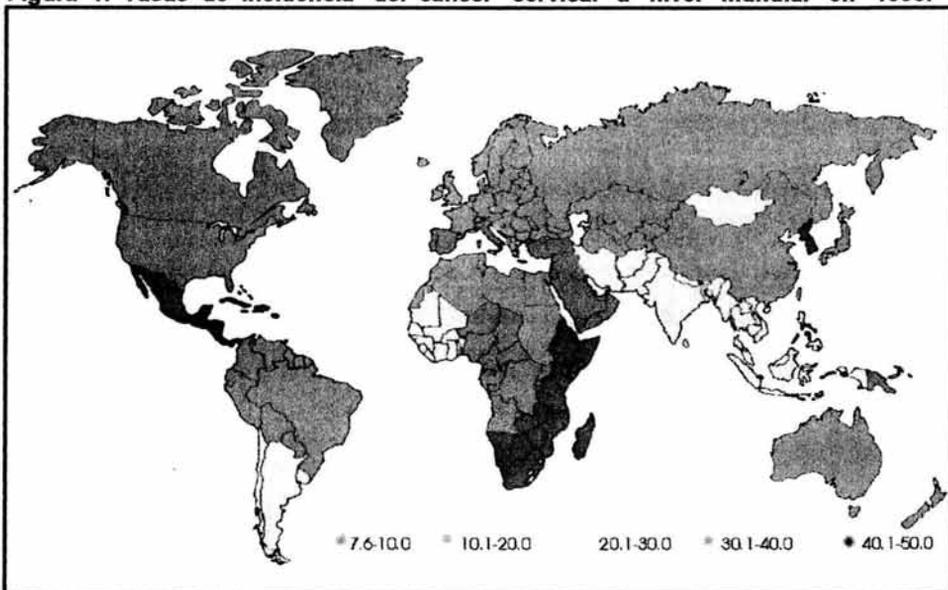
El CaCe, se constituye como la neoplasia femenina más frecuente a nivel mundial, de hecho, de acuerdo con datos reportados por la Asociación Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, del inglés: *International Agency for Research on Cancer*), ésta pasó del tercer lugar en la década de los 80's (Tomatis, 1990) al segundo lugar 10 años después en la década de los 90's (Parkin, 1992). Más recientemente, se ha estimado que de los 500 000 nuevos casos reportados en el mundo (Muñoz, 1997), 4 de cada 5 de ellos (80%), se presenta en los países en vías de desarrollo (Bosch, 1995).

En los países desarrollados, el cáncer cervical es una enfermedad poco común, debido a la implementación de programas de salud que poseen dos características importantes: una amplia cobertura y la accesibilidad del servicio. y al fácil acceso al monitoreo cervical. En estos países, se sabe que al menos el

50% de sus mujeres se han realizado un examen de citología cervical a lo largo de su vida (Magrath y Litvak, 1993).

Por otro lado, en los países en vías de desarrollo, donde se concentra el 75% de la población mundial y cuentan sólo con el 5% de los recursos económicos, sólo un pequeño porcentaje de ellas (5%) se han realizado esta prueba debido principalmente a que los programas de salud instituidos en estos países presentan serias dificultades técnicas y económicas, además de presentar una escasa cobertura y un poca accesibilidad a los servicios de salud (Magrath, 1993; Richart,1995). Por lo tanto, a escala mundial, la tasa de incidencia del cáncer cervicouterino se encuentra mucho más elevada en los países en vías de desarrollo que en los países desarrollados, detalle que puede observarse en la Figura 1 (Pontén, 1995, Parkin, 1993).

Figura 1. Tasas de incidencia del cáncer cervical a nivel mundial en 1995.



En esta figura se esquematiza la tasa de incidencia del cáncer cervical estandarizada por cada 100 000 mujeres, reportada por Pontén en 1995.

La Epidemiología Descriptiva de este tipo de cáncer nos indica que en África y Asia, el CaCe es la neoplasia femenina más común a excepción de los países con culturas musulmanas (Magrath y Litvak, 1993). En América, todos los países del continente a excepción de Canadá y Estados Unidos, se considera que el CaCe es un severo problema de salud pública, pues es en estos lugares en donde se han reportado las tasas de incidencia más elevada en los últimos 20 años (Hernández-Ávila,1997; Magrath y Litvak, 1993; Pontén, 1995; Reeves, 1989; Richart, 1995).

El CaCe, presenta una clara distribución mundial: es casi 4 veces más común en los países en desarrollo que en los países industrializados. Debido a la naturaleza y período de desarrollo de esta enfermedad son factibles su prevención y detección temprana (Magrath, 1993). Esto dio lugar a la creación de programas de monitoreo con resultados halagadores en los países industrializados, pues en ellos la tasa de incidencia del cáncer cervical ha podido abatirse en un 70% a un 90% (Richart, 1995).

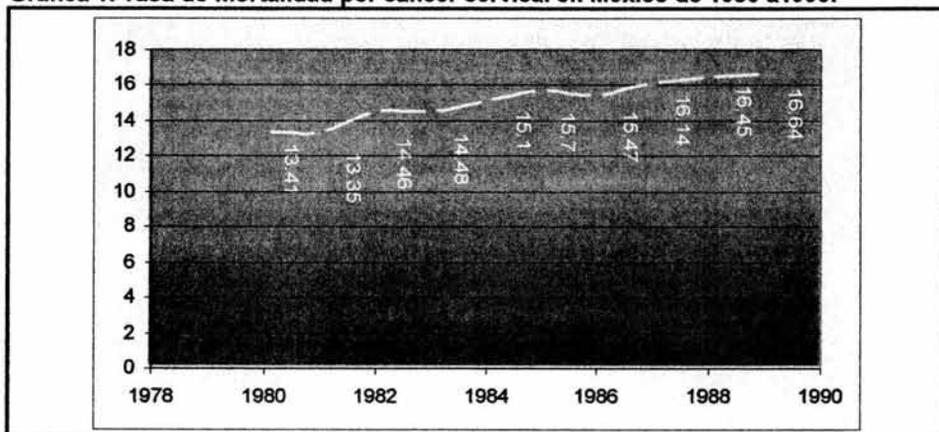
1. El caso de México

México cuenta con un programa de monitoreo cervical desde 1974, dentro del Programa de Detección Oportuna del Cáncer (DOC), a pesar de ello, no se ha registrado disminución en la tasa de mortalidad por CaCe (Lazcano-Ponce, 1996a; Lazcano-Ponce, 1999). En términos numéricos, la tasa de mortalidad por CaCe pasó de 13.41(es decir, 2 522 muertes por cada 100 000 mujeres mayores de 15 años) en 1980 a 16.11 (4 250 muertes) en 1990, esta tendencia se encuentra representada en la Gráfica 1.

El estudio realizado por Lazcano-Ponce y colaboradores acerca de la mortalidad nacional durante la década de 1980 a 1990, demostró el incremento de la tasa de mortalidad por CaCe. La Figura 2, contiene la tasa de mortalidad

promedio durante esta misma década para cada uno de los estados de la República Mexicana (Lazcano-Ponce, 1996a).

Gráfica 1. Tasa de mortalidad por cáncer cervical en México de 1980 a 1990.

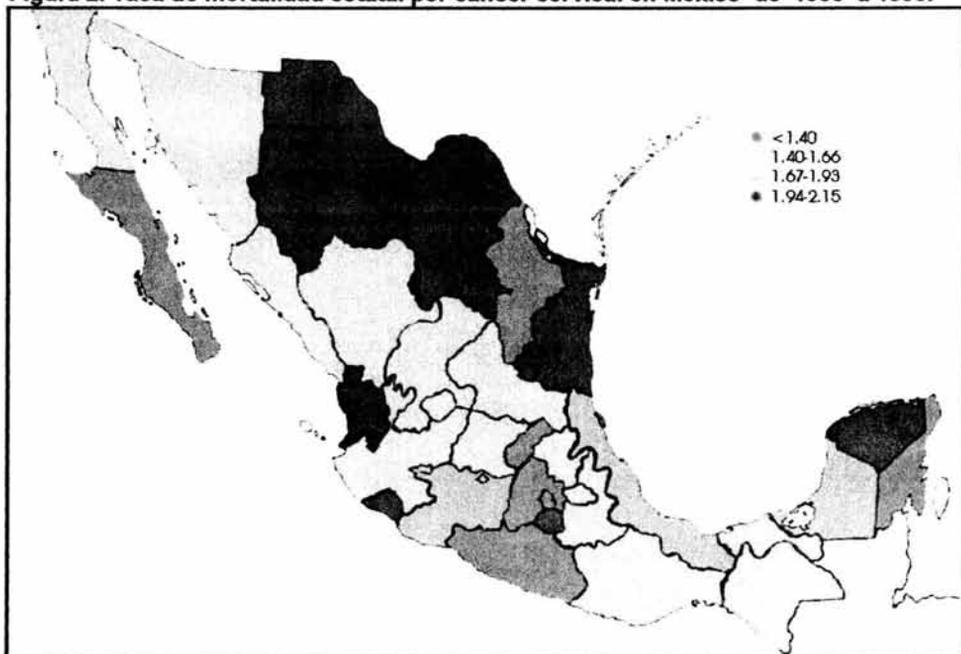


Tasa de mortalidad por CaCe por cada 100 000 mujeres mayores de 15 años.

Debido a los anteriores resultados, en 1995 se realizaron estudios de control de calidad que revelaron serias deficiencias en el programa de monitoreo, tanto en el ámbito técnico como en el diagnóstico, que aunado a una escasa cobertura y mal enfoque, explicaban su baja efectividad (Alonso de Ruíz, 1996; Hernández-Ávila, 1998; Lazcano-Ponce, 1996b; Lazcano-Ponce, 1997; Lazcano-Ponce, 1999).

Sin embargo, y a pesar de la reestructuración del Programa de Detección Oportuna del Cáncer Cervical, resultante de los estudios de calidad no se ha frenado el aumento de la tasa de mortalidad nacional por CaCe, pues, por el contrario, de acuerdo con datos revelados recientemente, por la Secretaría de Salud, se sabe que aproximadamente mueren 1.5 mujeres cada 2 horas, es decir, que anualmente se registran 6 570 muertes debidas al cáncer cervical en México (Sánchez, 1998).

Figura 2. Tasa de mortalidad estatal por cáncer cervical en México de 1980 a 1990.



En esta figura se presentan las tasa de mortalidad estatales por cada 100 000 mujeres, ajustadas para el modelo de regresión de Poisson, mediante el estudio de las actas de defunción para el período comprendido entre 1980 y 1990 (Lazcano-Ponce, 1996; Lazcano-Ponce, 1999).

B. Métodos de diagnóstico del cáncer cervical

Existen varios métodos de detección del CaCe, que dependiendo del enfoque y alcance deseado pueden dar valiosa información acerca del padecimiento. Entre estas pruebas podemos mencionar a las tradicionales de diagnóstico clínico, en donde se puede detectar la presencia o ausencia de CaCe, como son la Citología exfoliativa de cuello uterino (Prueba de Papanicolaou y Traut), la Histopatología de biopsia dirigida y la Colposcopia. Actualmente, con el desarrollo de nuevas tecnologías, la identificación de un agente causal y la estandarización de métodos considerados como netamente científicos, se ha logrado que a través de procedimientos de Biología Molecular como PCR, Captura de Híbridos o Inmunofluorescencia, con estas pueden detectarse lesiones precursoras de esta enfermedad.

1. Citología exfoliativa del cuello uterino

En 1924, George N. Papanicolaou, accidentalmente observó células cancerígenas de cérvix uterino en frotis vaginales. Para 1928, publicó sus observaciones, ignorando que un patólogo rumano Aureli Babes, había introducido el muestreo de células cervicales para el diagnóstico del cáncer cervicouterino dos años antes, publicando sus resultados apenas un mes antes que Papanicolaou (Koss, 1989). Actualmente la prueba se conoce como citología exfoliativa del cuello uterino o prueba de Papanicolaou y Traut y se utiliza en la clínica con buenos resultados desde 1943 (Jones, 1990).

Figura 3. Citología cervical exfoliativa: toma de muestra y su estudio microscópico.



a. Diagnóstico microscópico de las muestras. b. Cepillo cervical. c. Hisopo.

La prueba requiere de muestras celulares exfoliadas o desprendidas de cuello cervical y vagina. Aunque estas células provienen de la superficie de los órganos en cuestión, constituyen un buen indicador de los procesos que se llevan a cabo en ellos. La técnica consiste en la toma de una muestra de las células endo y exocervicales, mediante aspiración (pipeta de plástico o vidrio con bulbo) o por exfoliación con cepillo endocervical o espátula plástica o de madera (como el de la Figura 3), se extienden rápidamente sobre un portaobjetos y se fijan inmediatamente con alcohol etílico al 95% (o fijadores comerciales), posteriormente se tiorien con hematoxilina y eosina para determinar su estado, el que se reporta en tres grados: benigno, displasia moderada o carcinoma de células planas (Jones, 1990).

Esta técnica es indolora, barata y precisa, por lo que es ideal para la detección de anomalías epiteliales del cérvix uterino en población abierta (Jones, 1990). Las características a identificar por medio de esta técnica es la presencia de coilocitos y células epiteliales inmaduras. (Miessels, 1976).

2. Histopatología cervical

La Histopatología cervical es una técnica basada en la observación de anomalías epiteliales estructurales y de desarrollo de las células que conforman el cérvix uterino. Esto se logra haciendo una biopsia del tejido y observándola al microscopio.

La técnica consiste en la obtención de una biopsia cervical con una pinza de biopsia como la que se presenta en la Figura 4. Se fija inmediatamente en formalina y se procede a su inclusión en parafina. Después se hacen microcortes con un microtomo, que se suspenden en agua fría y se fijan sobre un portaobjetos. Se desparafinan los cortes y se tiñe el tejido con hematoxilina y eosina y, se observan al microscopio. Los resultados se reportan como infección por virus del papiloma humano, neoplasia intraepitelial cervical estadios I a III, carcinoma *in situ* y carcinoma micro o francamente invasor (Reid 1985). La sensibilidad de esta técnica es tan alta, que sus resultados son considerados como el "estándar de oro" del diagnóstico clínico (Reid, 1984).

Figura 4. Toma de biopsia dirigida para el estudio histopatológico del cérvix uterino.



La toma de biopsia se hace generalmente dirigida por Colposcopia, abarcando las zonas con sospecha de CaCe o sus lesiones precursoras.

Con esta técnica se busca evaluar el grado de reemplazo del grosor del epitelio plano cervical, por células anormales indiferenciadas, así como la integridad de la membrana basal del epitelio mismo y el involucramiento o no de vasos sanguíneos.

3. Colposcopia

En 1925, Hans Hinselman inventó un aparato consistente en un par de lentes binoculares que amplifican la imagen de 6X hasta 40X, provisto de una fuente de iluminación al que llamó colposcopio (Figura 5). Este aparato permite la observación estereoscópica del tracto genital inferior, que en condiciones ade

Figura 5. Inspección de pacientes durante la consulta colposcópica.



La Colposcopia permite hacer visualizaciones de lesiones precursoras de CaCe que se escapan a simple vista.

cuadas se puede visualizar claramente toda el área del la zona de transformación cervical y el canal endocervical. La Colposcopia puede identificar lesiones acetoblancas con o sin patrones vasculares característicos de lesiones cervicales no visibles a simple vista. Hasta entonces, el diagnóstico del cáncer del cuello del útero se hacía por simple observación y biopsia de lesiones sangrantes o sospechosas (Meisels y Morin, 1997; CPCWeb, 2000).

Los primeros trabajos de Hinselman se publicaron a principios de la década de los 30's, en ellos, afirmaba que al aplicar una solución de ácido acético al 3% (Prueba de Hinselman), se ponían de manifiesto zonas de leucoplasia (ó acetoblancas) que reconoció como lesiones precursoras del cáncer, es decir, precancerosas (Figura 6). Estos resultados contradecían francamente la teoría de la generación abrupta del cáncer a partir de la mutación de una célula normal, dándole un aspecto evolutivo al desarrollo de esta enfermedad (Meisels y Morin, 1997; CPCWeb, 2000).

Figura 6. Aspecto de lesiones en el cérvix uterino tras la aplicación ácido acético.



Tras la aplicación de soluciones de ácido acético al 15 %, pueden verse claramente las zonas acetoblanco que se sospecha son lesiones precursoras del CaCe, así como algunas características de valor diagnóstico. Estas zonas permiten una fácil y rápida toma de biopsia para su posterior determinación histopatológica.

Las críticas hacia el nuevo procedimiento de estudio de lesiones cervicales se hicieron cada vez más duras, lo que condujo a Hinselmann en 1934, a someter su trabajo al escrutinio de un tribunal conformado por los mejores patólogos alemanes de la época quienes reconocieron que las leucoplasias constituían diminutos cánceres del cuello del útero. A pesar del dictamen de este tribunal, la técnica nunca encontró eco en los médicos de entonces, salvo por algunas honrosas excepciones en Europa y Sudamérica (CPCWeb, 200).

Una variante en la determinación de lesiones precancerosas por medio de Colposcopia, fue introducida por Walter Shiller, quien descubrió en 1928, que el epitelio escamoso anómalo o carcinomatoso carece de glucógeno; mientras que el epitelio diferenciado sano contiene grandes cantidades el mismo y, por lo tanto, es factible de colorearse *in vivo* mediante soluciones de lugol. Este procedimiento se conoce ahora como Prueba de Shiller, también para detectar zonas anormales en el epitelio cervical (CPCWeb, 2000; van Le, 1993).

Desde hace algunos años se ha sugerido en numerosos artículos la importancia de la evaluación colposcópica en toda paciente con citología anormal, debido a que la utilización del colposcopio permite observar el sitio, extensión y tamaño de la lesión para poder tomar una biopsia directa (Figura 4), pero que la aclaración definitiva de una sospecha citológica o colposcópica será por estudio histopatológico (Tovel, 1976; Bamford, 1983; Ruíz, 1985; Spitzer, 1987; Edibiri, 1990; McCord, 1991; von der Meden, 1995). El manejo multidisciplinario de este padecimiento nos ofrece mayor certeza en el diagnóstico al complementar entre sí los hallazgos de cada técnica (Schneider, 1988; Vasconcelos, 1992).

Tradicionalmente en México, el estudio del cuello uterino se ha basado en la observación microscópica (Citología o Histopatología), pero existe una enorme laguna entre la observación a simple vista y la observación microscópica, laguna que puede ser superada por la Colposcopia, al permitir el discernimiento entre la normalidad y la patología del cérvix uterino. Esta técnica es una excelente

herramienta, sobre todo en la detección de IVPH, NIC, cambios en la morfología vascular: puntilleo, mosaico, vasos atípicos; así como en otro tipo de lesiones tisulares que no pueden observarse a simple vista. El recurrir al colposcopista brinda una mayor seguridad al obtener un reporte donde se certifica la presencia, el grado y las características de la lesión para que el tratamiento sea específico para cada paciente (González-Sánchez, 1998; von der Meden, 1995).

La Colposcopia como método de evaluación tiene sus limitantes, entre las que se encuentran el estudio de pacientes en edad perimenopáusica, en donde la unión escamo-columnar tiende a introducirse al canal endocervical, lo que puede originar un porcentaje de falsos negativos que van desde el 6% hasta el 18% (Hellberg, 1990; von der Meden, 1995).

4. Diagnóstico molecular

El diagnóstico molecular tanto del cáncer cervicouterino como de las lesiones preneoplásicas, se basa en el hecho de que la mayoría de dichas lesiones son provocadas por el VPH. De esta manera, los estudios moleculares se enfocan en la detección de DNA viral (PCR y Captura de Híbridos) o de anticuerpos específicos contra proteínas virales.

a. Pruebas enfocadas a la detección de DNA viral

Actualmente, las pruebas enfocadas a la detección de DNA viral más usadas son PCR y Captura de Híbridos.

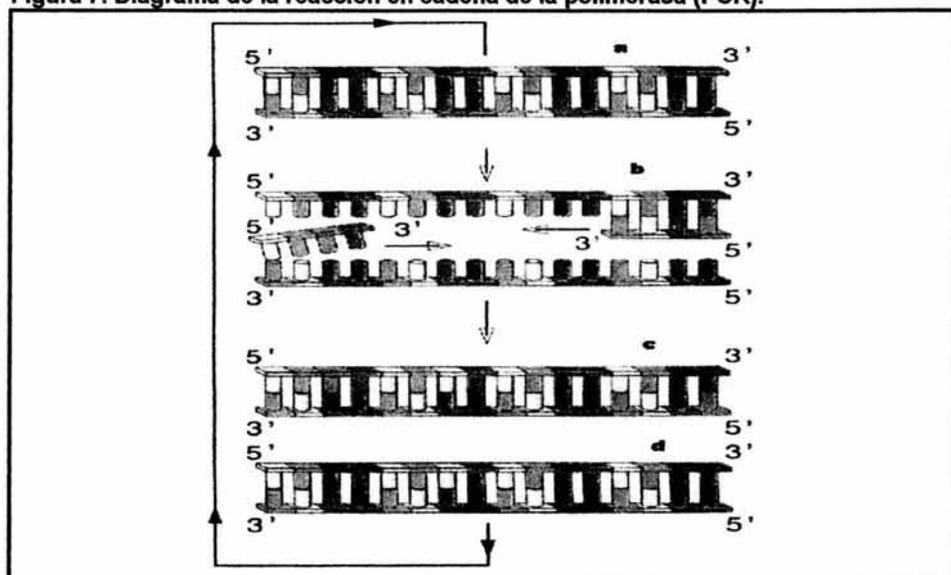
- PCR (*Polymerase Chain Reaction*); reacción en cadena de la polimerasa)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés: *polymerase chain reaction*), es un procedimiento que permite la amplificación enzimática de fragmentos específicos de DNA (Ausebel, 1989; Kwok, 1989). Este

método es tan sensible, que es capaz de amplificar una sola molécula de DNA (Banerjee, 1995). La utilización de DNA-polimerasas termoestables y la automatización del proceso se le deben a Kary Mullis (Innis, 1990).

En general, el proceso consta de tres etapas: primero la desnaturalización de las cadenas de DNA, segundo, el alineamiento de los oligonucleótidos a sus secuencias blanco específicas y, tercero, la elongación o síntesis de secuencias de DNA complementarias (Figura 7).

Figura 7. Diagrama de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



a. Secuencia blanco de DNA bicatenario. b. Desnaturalización del DNA. c. Alineamiento de nucleótidos. d. Elongación de segmentos específicos. f. Renaturalización de DNA bicatenario. g. Repetición del ciclo.

El apareamiento de los oligonucleótidos (en inglés: primers) a su secuencia blanco específica, está determinada por su secuencia nucleotídica. Dicho apareamiento se realiza a una temperatura óptima a la que se llama normalmente T_M (del inglés: *temperature melting*; temperatura de unión). La determinación de la T_M específica de cada par de oligonucleótidos resulta de vital importancia para asegurar sólo la amplificación del segmento deseado, evitando de esta manera, la

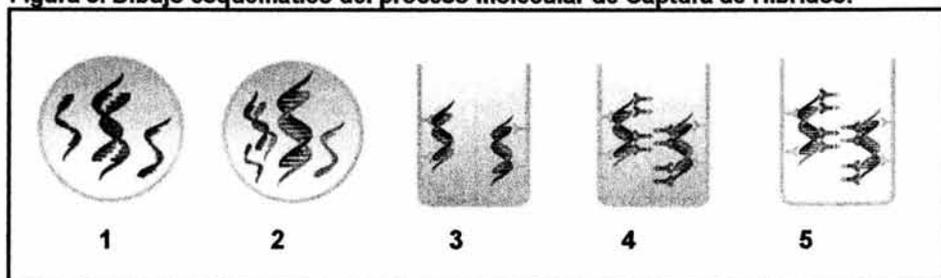
amplificación de segmentos inespecíficos debido a un error de apareamiento en condiciones de baja astringencia (Sambrook, 1989).

- Captura de Híbridos

La captura de híbridos se basa en la capacidad del RNA para formar pequeños segmentos híbridos con una secuencia de DNA específica (Snudstad, 1997). En esta técnica se detectan señales luminosas emitidas por la hibridación de sondas sintéticas de RNA (ácido ribonucleico de VPH con DNA de VPH, provenientes de muestras de tejido infectado mediante quimioluminiscencia cualitativa (Figura 8).

La prueba consta de cinco etapas principales: primero, la desnaturalización del DNA bicatenario, mediante el incremento del calor; segundo, la hibridación de la sonda de RNA a su secuencia blanco específica en el DNA desnaturalizado; tercero, la captura de híbridos de DNA-RNA mediante un anticuerpo específico marcado; cuarto, la unión química de los conjugados y la amplificación de la señal luminosa; y, quinto, la detección de dicha señal luminosa mediante quimioluminiscencia.

Figura 8. Dibujo esquemático del proceso molecular de Captura de Híbridos.



1. Desnaturalización de la muestra. 2. Hibridación del DNA con la sonda de RNA. 3. Captura de Híbridos. 4. Reacción con el conjugado. 5. Amplificación de la señal de hibridación.

b. Pruebas enfocadas a la detección de proteínas virales

La detección de proteínas virales se hace principalmente mediante la aplicación de anticuerpos específicos a secuencias determinadas de dichas proteínas. Una de las más utilizadas es la inmunofluorescencia (Eisen, 1984; Roitt, 1998).

- Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es un método de localización que nos permite detectar secuencias particulares de aminoácidos en proteínas específicas llamadas antígenos. Los anticuerpos son gammaglobulinas sintetizadas por el sistema inmunológico de un organismo cuando se le expone a una o más sustancias extrañas (Eisen, 1984; Roitt, 1998). En 1941, Conos y colaboradores, crearon un anticuerpo específico al que marcaron con isocinato de fluoresceína, la cual emite una luz verde amarillenta al exponerse a la luz ultravioleta (UV); por consiguiente, el anticuerpo marcado reconoce a su antígeno de forma específica formando un complejo antígeno-anticuerpo que emite una señal luminosa (Eisen, 1984; Roitt, 1998).

C. Factores de riesgo asociados al cáncer cervical

El cáncer es una enfermedad multifactorial, en particular, el desarrollo del cáncer cervical se asocia comúnmente a los siguientes factores de riesgo:

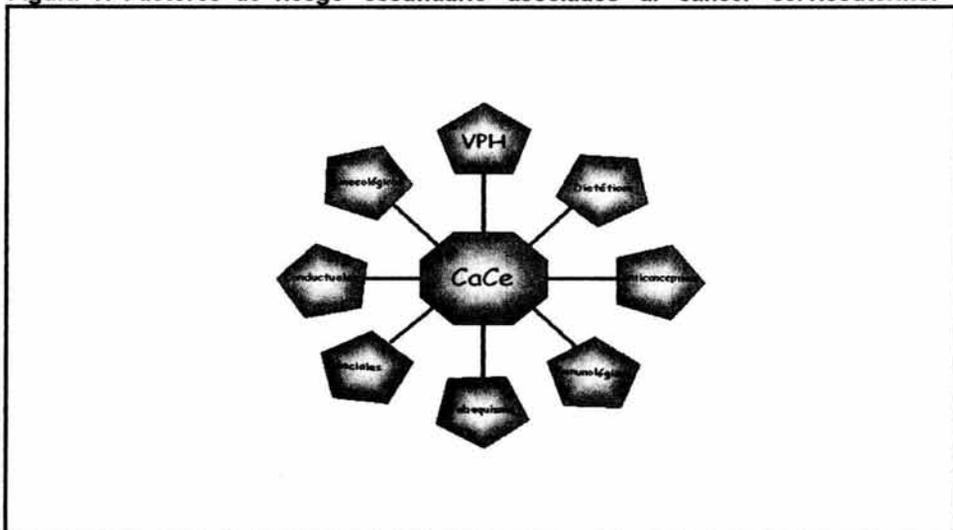
1. Factores ginecológicos y de conducta

El inicio de la vida sexual a temprana edad y la multiparidad se han evaluado en diversos estudios para determinar si intervienen o no en el desarrollo del cáncer cervical. De estos estudios, se desprende que ambos hechos constituyen factores de riesgo predisponentes al CaCe, debidos principalmente a

los traumatismos mecánicos sufridos por el cérvix durante el alumbramiento, pues de acuerdo con varios autores, provocan la exposición del estrato basal del epitelio cervical que se considera es el sitio de infección del virus del papiloma humano (Figura 10) (Fassal, 1981; Clarke, 1985; Park, 1995; Kiviat, 1987).

Otro factor predisponente de CaCe es la conducta sexual de las mujeres y de sus parejas. La etiología viral del cáncer cervical y la cada vez más aceptada consideración como una enfermedad de transmisión sexual (ETS), apoyan esta aseveración, pues al aumentar el número de compañeros sexuales aumenta el riesgo de infección y, por lo tanto, el riesgo de sufrir CaCe (Figura 10) (Cross, 1968; Priddan, 1971; Jordan, 1981; Buckley, 1981; Stone, 1989; Melnick, 1991; Tomesello, 1997; Hernández-Ávila, 1998).

Figura 9. Factores de riesgo secundario asociados al cáncer cervicouterino.



La etiología del cáncer cervical es multifactorial, sin embargo, existen algunos que predisponen a una mujer con mayor riesgo que a otras.

Por último, se ha reportado la transmisión vertical de VPH del tacto genital, tanto de bajo (Oriel, 1971; Gissmann, 1983; McDonell, 1987), como de alto riesgo (Cason, 1995; Jenison, 1990; Sedlacek, 1989). Estos virus se transmiten de las madres hacia los hijos de la misma manera que sucede con el virus de las

hepatitis B (Okada, 1976) y C (Ohto, 1994); el virus de la inmunodeficiencia adquirida (Boylard y Stein, 1991); el herpes simple (Hildesheim, 1991; Witley, 1993); el citomegalovirus (Stago, 1986) o incluso el *Treponema pallidum*, la *Chlamidia trichomatis* y la *Neisseria gonorrhoeae* (Greenoug, 1992).

Las vías de adquisición de las infecciones perinatales de VPH son: los canales de parto infectados o el ascenso de la infección al desgarrarse la membrana amniótica (Kaye, 1994; Cason, 1995). La infección perinatal con VPH's de alto riesgo puede conducir a la inducción de tolerancia inmunológica específica, a la persistencia de infecciones virales de corta duración, y, en última instancia, al desarrollo de infecciones cervicales premalignas y malignas (Oriol, 1971; Kaye, 1994; Casson, 1995).

2. Sociodemográficos

De acuerdo a los estudios epidemiológicos, se acepta de manera general que el cáncer cervical, afecta en mayor grado a mujeres de bajos recursos económicos y de escasa educación, debido a la falta de atención médica aunado a la baja cobertura de los servicios (Figura 11) (Jordan, 1981; Melnick, 1991; Hernández-Ávila, 1998).

3. Tabaquismo

En 1977, se sugirió por primera vez, la existencia de una relación directa entre el tabaquismo y el cáncer cervical. Con el tiempo, los estudios confirmaron dicha relación y, se ha sugerido que los productos del tabaco pueden actuar sinérgicamente con el VPH o que pueden facilitar su penetración al ocasionar una inmunosupresión local del cérvix (Fassal, 1981; Lyon, 1983; Clarke, 1985; Torres-Lobatón, 1987; Melnick, 1991; Hernández-Ávila, 1997; Hernández-Ávila, 1998).

4. Anticonceptivos orales

El consumo de anticonceptivos incrementa el riesgo de CaCe. Este riesgo se incrementa de manera proporcional al tiempo de uso de los mismos, principalmente los de administración oral. A este respecto, se sugiere que las hormonas pueden actuar como cofactores o potenciadores de la transcripción de los VPH's al enmascarar receptores de superficie en la membrana celular (Melamed, 1973; Boyce, 1977; Stern, 1977; Butterworth, 1982; Clarke, 1985; Torres-Lobatón, 1987; Melnick, 1991; Hernández-Ávila, 1997; Hernández-Ávila, 1998).

5. Inmunológicos

Las mujeres inmunosuprimidas químicamente, por ejemplo, las que son sometidas a transplantes, son más propensas a las infecciones por virus del papiloma humano en comparación con las mujeres en general, lo que indica que el sistema inmunológico juega un importante papel en la infección por VPH y que sólo en aquellos casos en los que éste falla, puede progresar una infección hacia un cáncer (Matas, 1975; Porreco, 1975; Schneider, 1983; Silman, 1984).

Las mujeres infectadas con el virus de la inmunodeficiencia adquirida (HIV, del inglés: *human immunodeficiency virus*), tienen una alta prevalencia de DNA de VPH (Mainman, 1991; Vermund, 1991). Comparadas con la población femenina en general, las mujeres HIV positivas tienen mucho mayor riesgo de desarrollar lesiones cervicales premalignas encontrándose frecuentemente infecciones por VPH en mujeres VIH positivas, (Lovejoy, 1994).

6. Dietéticos

Al igual que en otros tipos de cáncer, en el cáncer cervical, la dieta juega un importante papel tanto en su desarrollo como en su propensión (Potischman y

Brinton, 1996). Estudios realizados en cuanto a la baja aportación de vitaminas C, E y folacina en las mujeres, se traduce en un incremento en el riesgo de desarrollo de neoplasias cervicales (Buckley, 1981). El β -caroteno, es otro de los nutrientes que se ha demostrado que su deficiencia aumenta el riesgo de desarrollar en el NIC y en el cáncer cervical (La Vecchia, 1984; Herrero, 1991).

7. Agentes infecciosos

Se ha propuesto que los siguientes agentes infecciosos de transmisión sexual tienen un efecto directo en el desarrollo del cáncer cervical: *Chlamydia trichomatis*, el virus del herpes genital de tipo II (VHG-2), el citomegalovirus humano (CMVH) y el virus del papiloma humano (VPH). Sin embargo, los estudios sólo han afirmado que el desarrollo de este tipo de cáncer es de origen multifactorial (de San José, 1994, Koffa, 1995).

Por otro lado, en cuanto al virus del papiloma humano (VPH), se ha reforzado cada vez más que es el único agente infeccioso asociado al CaCe (Walboomers, 1999), por su importancia en el desarrollo y promoción del cáncer cervical, se tratará más adelante con mayor detalle.

D. Anatomía del aparato reproductor femenino

El aparato genital femenino se origina a partir del mesodermo cercano al borde superior de la cavidad celómica, sin embargo, y en función del avance del desarrollo embrionario, este aparato se aloja de manera definitiva en la cavidad pélvica formada por los huesos púbico, íleon e isquion, conocida como cadera o cintura pélvica (Figura 10).

En la madurez, suele dividírsele de manera arbitraria en dos grandes regiones: genitales externos o vulva, compuesta por labios mayores y menores,

orificio uretral, clítoris y perineo; y genitales internos que están conformados por ovarios, oviductos, útero, cérvix y vagina (Romer, 1981).

Figura 10. Dibujo esquemático de la ubicación del cérvix uterino humano.



El aparato reproductor femenino se aloja en la cavidad localizada en la cintura pélvica femenina.

1. Cérvix normal

El cérvix uterino constituye la parte más baja del útero y se divide en dos porciones: la porción uterina y la porción vaginal. Está constituido principalmente de tejido conjuntivo denso y un 15% de músculo liso. La porción vaginal está cubierta por epitelio estratificado escamoso no queratinizado (salvo en ciertos estados patológicos), mientras que el canal cervical (endocérvix) está recubierto por epitelio columnar secretor simple (Borysenko, 1985).

El epitelio estratificado escamoso no queratinizado de la porción vaginal del cérvix, está constituido por 5 capas celulares organizadas de la siguiente manera: el estrato basal, compuesto por pequeñas células cúbicas con grandes núcleos; el estrato espinoso profundo, también conocido como estrato parabasal, contiene varias capas de células poliédricas con grandes núcleos; las células del estrato espinoso superficial tienden a aplanarse, al mismo tiempo que se forman grandes vacuolas en el citoplasma y los núcleos comienzan a vesicularse; en el estrato granuloso, las células están sumamente aplanadas y tanto sus citoplasmas como sus núcleos, se tiñen fuertemente; y, por último, es estrato superficial, que está

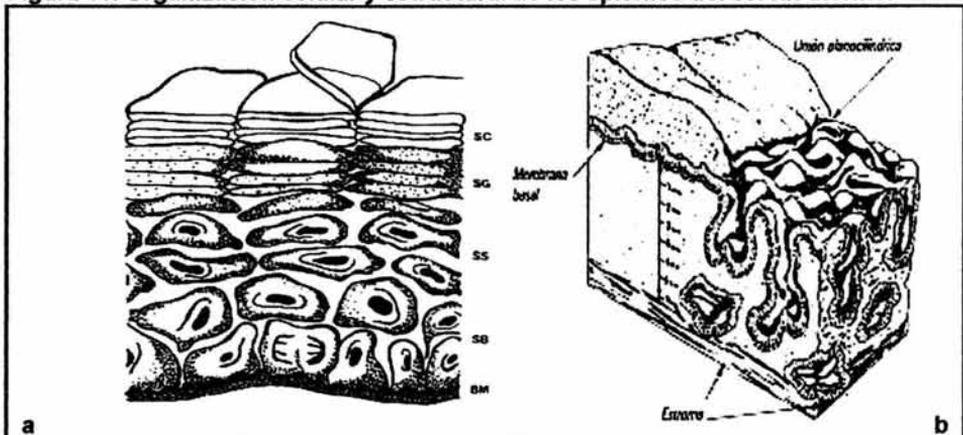
constituido por varias capas de células aplanadas con núcleos picnóticos (Borysenko, 1985). La Figura 11a, nos muestra una representación esquemática de la organización celular de este tipo de epitelio.

Como se mencionó anteriormente, el canal endocervical está cubierto por un epitelio columnar simple secretor de moco. Este epitelio se encuentra sumamente plegado formando pseudoglándulas o criptas a lo largo del canal. La unión anatómica entre el endo y el exocérnix es llamada unión escamocolumnar y aunque no coinciden necesariamente en un mismo punto, sí se encuentran juntos (Borysenko, 1985).

La zona de transformación (Figura 11b), también llamada unión planocilíndrica o escamocolumnar, es la zona donde se unen el epitelio plano estratificado del exocérnix y el epitelio cilíndrico del conducto endocervical; que a pesar de que se encuentra en las cercanías del orificio cervical externo, no es un punto de referencia anatómico estático. En el cuarto mes de vida fetal, el epitelio cilíndrico de la porción superior de la vagina y el exocérnix es reemplazado por epitelio plano estratificado, lo que representa el primer cambio importante en la localización de la zona de transformación. A lo largo de la vida de la mujer, el aumento del tamaño del cuello uterino se relaciona con la eversión del epitelio cilíndrico hacia el exocérnix anatómico en dos ocasiones más: durante la menarquia y en el embarazo (Jones, 1990).

Con los años, el epitelio cilíndrico es reemplazado en forma gradual por epitelio plano estratificado, proceso normal al que se le llama metaplasia, que ocurre poco a poco y durante gran parte de la vida de la mujer, pero es sumamente activo durante el período intrauterino, después de la menarquia y después del primer embarazo. También se ha observado que las células planas metaplásicas fagocitan el detritus con el que entran en contacto, lo que puede hacerlas más susceptibles a la transformación neoplásica al entrar en contacto con los VPH's (Coppleson, 1978).

Figura 11. Organización celular y estructural de los epitelios del cérvix uterino.



a. Epitelio Escamoso. Las abreviaciones de abajo hacia arriba significan: BM, membrana basal; SB, sustrato basal; SE, sustrato espinoso; SG, sustrato granuloso; y, SC, sustrato cómeo. b. Epitelio columnar. Unión escamo-columnar del cérvix uterino. Tomado de Jones, 1990

E. Historia natural del cáncer cervical

El cáncer cervicouterino, es una enfermedad que se desarrolla poco a poco a lo largo del tiempo, los eventos que se enumeran a continuación, se han separado arbitrariamente para facilitar su estudio. Sin embargo, no hay que perder de vista que son continuos y que en muchas ocasiones no es fácil evidenciar un estadio de otro.

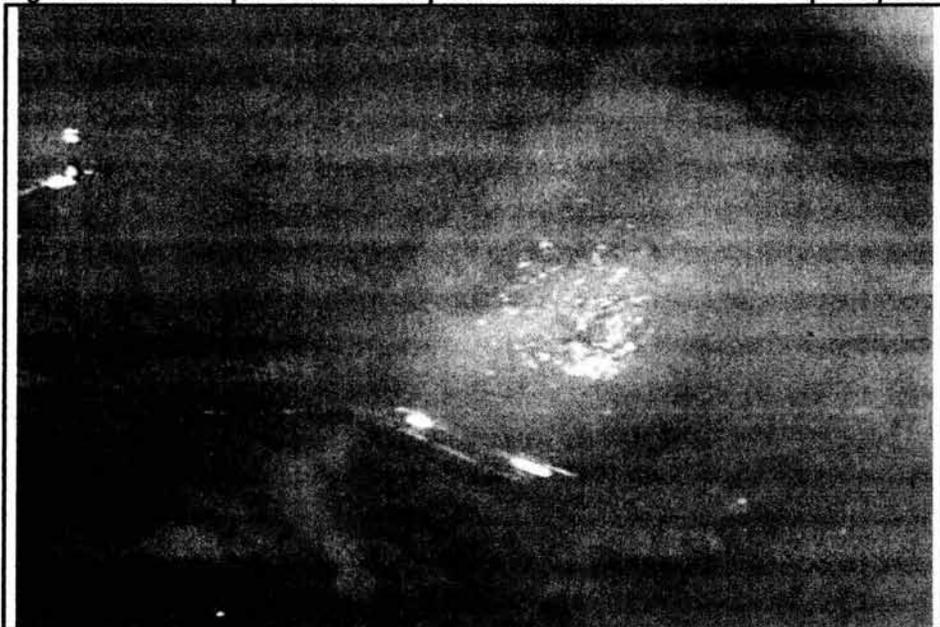
1. Infección por virus del papiloma humano

Las lesiones cervicales asociadas a la presencia del VPH, normalmente se localizan en la zona de transformación y en raras ocasiones, en el canal endocervical, se caracterizan por su apariencia acetoblanca con variación en la intensidad del color, sus límites están bien definidos, circundados por epitelio metaplásico, carece de vascularización visible y, algunas veces, la lesión presenta bordes afilados o puntos fuera de ella a lo que se le llama puntuación reversa

(Meisels y Morin; 1997). Esta infección produce lesiones epiteliales proliferativas que a menudo son polipoides. (Figura 12).

Esta infección es generalmente, asintomática (Reid, 1984). Las infecciones cervicales por VPH generalmente se manifiestan como áreas epiteliales hiperplásicas difusas que se visualizan perfectamente después de la aplicación de ácido acético al 15% (v/v). En este tipo de lesiones se piensa que el cambio acetoblanco se puede atribuir a la reacción transitoria entre el ácido acético y la envoltura proteica de los papilomavirus en los queratinocitos infectados (Reid, 1985).

Figura 12. Infección por Virus del Papiloma Humano: observación colposcópica.



Resalta la zona de infección por virus del papiloma humano en color blanco tras la aplicación de ácido acético al 15%. Tomado de CPCWeb, 2000.

2. Neoplasia intraepitelial cervical

La neoplasia intraepitelial cervical, se caracteriza por presentar lesiones acetoblanco que se localizan alrededor de la zona de transformación en donde se

alternan superficies planas con contornos geográficos agudos e interdigitaciones hacia el canal endocervical., las primeras, signos de metaplasia, en tanto que las segundas son indicativas del grado de severidad de la lesión. A mayor incremento en la severidad de la lesión, el mosaicismo se vuelve cada vez más irregular, mientras que el epitelio tiende a sobrevascularizarse (Miesels y Morin, 1997).

En este tipo de lesión, son comunes las alteraciones tanto en la estructura, como en la distribución y características de las células de las distintas capas epiteliales, aunque son lesiones benignas, algunas de ellas implican la posibilidad de progresión, por lo que son consideradas como lesiones preneoplásicas. Normalmente se encuentran patrones vasculares como el puntilleo y el mosaicismo que conforman la clave del diagnóstico colposcópico (Figura 13).

Figura 13. Neoplasia intraepitelial cervical (NIC): observación colposcópica.



Resalta en la figura la zona de epitelio acetoblanco tras la aplicación de una solución de ácido acético al 15%. Tomado de CPCWeb, 2000.

Existen diferentes grados histológicos de acuerdo al grado de alteraciones presente: NIC I; NIC II Y NIC III. Estas lesiones no producen síntomas, se desarrollan en forma silenciosa, de allí la importancia de su control periódico, ya que sólo pueden ser detectadas mediante el Papanicolaou, Colposcopia y/o diagnosticadas por biopsia mediante Histopatología. Se piensa que en las lesiones de alto grado de malignización, el cambio acetoblanco del epitelio ocurre porque la deshidratación osmótica acentúa el alto contenido de la cromatina ópticamente densa (Reid, 1985).

3. Carcinoma cervical

El carcinoma cervical (Figura 14), es una lesión localizada en la zona de transformación que se puede diferenciar perfectamente de la metaplasia epitelial cervical debido a que el grosor completo del epitelio cervical es sustituido por células anormales indiferenciadas (Miesels y Morin, 1997).

Figura 14. Carcinoma cervical: observación colposcópica de la lesión en el cérvix.



Resalta la observación del epitelio acetoblanco, así como el involucramiento de vasos sanguíneos y características como puntilleo y mosaicismo. Tomado de CPCWeb, 2000.

Se encuentra sumamente vascularizada y el tejido es friable, es decir, que se despega con mucha facilidad ocasionando hemorragias en el área afectada. Debido a la presencia de VPH, también presenta coloración acetoblanca durante el estudio colposcópico, pero su intensidad y geografía es muy variable (Miesels y Morin, 1997).

Existen dos estadios del carcinoma cervical, que se definen por la integridad de la membrana basal de su epitelio cervical. De este modo, se le llama carcinoma *in situ*, al desarrollo y proliferación de células neoplásicas sin compromiso de la membrana basal de epitelio. Por otro lado, cuando la membrana basal del epitelio es traspasada, se habla de un carcinoma invasor (Jones, 1990).

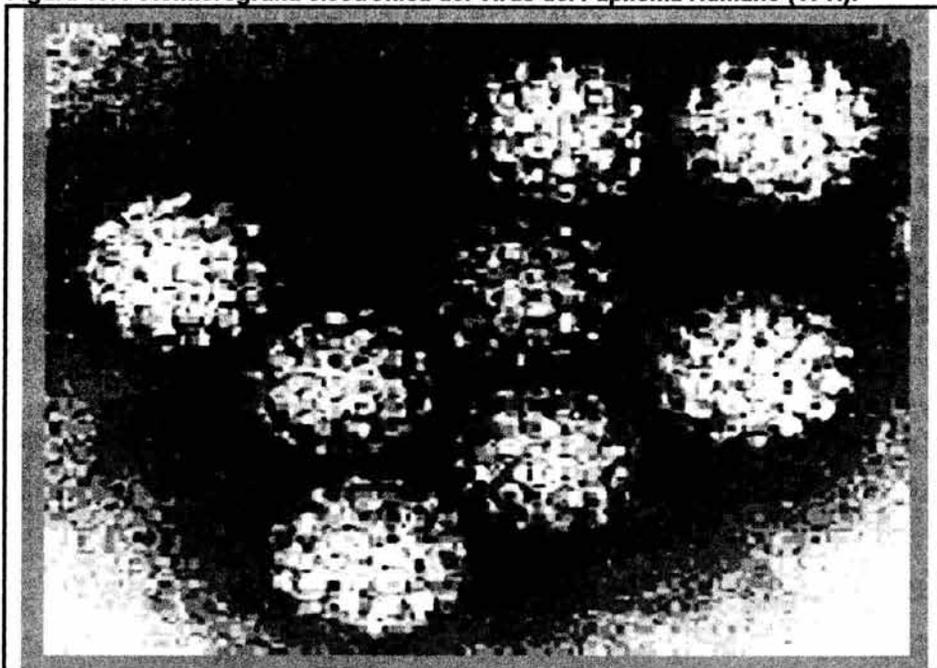
F. Virus del Papiloma Humano (VPH)

La historia de los VPH's, se remonta hasta el año 25 A.C., cuando Celso describe por primera vez las verrugas genitales. Durante los siguientes años, tanto los romanos como los griegos resaltaron la importancia de la transmisión sexual de estas verrugas asociadas a prácticas homosexuales principalmente. En la Edad Media, el avance en el conocimiento de estos padecimientos fue casi nulo. En 1793, Bell observó que las verrugas genitales eran independientes de la sífilis, enfermedad a la que se le atribuían estas manifestaciones. No fue sino hasta 1903, que con los experimentos de Ciuffo, se reconoció el origen viral de las verrugas de la piel. Sin embargo, el origen viral de las verrugas genitales fue establecido en 1924, con los experimentos de Serra, quien utilizó extractos filtrados de condiloma acuminado de pene para producir verrugas de piel en humanos voluntarios. En 1949, se observaron por primeras vez las partículas virales y, para 1968, Strauss identificó el primer virus del papiloma cutáneo, mientras que Dune encontraba al agente viral causante de los condilomas genitales. Tiempo después, Almeida demostró la heterogeneidad de los tipos de infección por virus del papiloma humano, pero no es sino hasta 1970, cuando zur

Hausen, relaciona a los VPH's con ciertos procesos carcinogénicos (Vasconcelos, 1992; Meisels y Morin, 1997).

Los virus del papiloma humano son un pequeño grupo virus de DNA (Figura 15) que se agruparon anteriormente junto a los poliomavirus y a los vacuolovirus para formar la familia de los **papovavirus** (el término **papovavirus**, se deriva de las primeras dos letras de los tres primeros virus agrupados en esta familia: el **p**apilomavirus del conejo, el **p**oliomavirus del ratón y el virus **v**acuolante del simio). Todos estos virus son de talla pequeña, no están encapsulados, presentan una cápside proteica icosaédrica, un genoma de DNA circular bicatenario unido a complejos proteicos semejantes a las histonas y al núcleo como lugar de reproducción (Broker y Botcham, 1986, Fields, 1996). Actualmente los Papovaviridae se han dividido en dos familias: Poliomaviridae y Papilomaviridae (a su vez dividido en cinco subgrupos: A,B,C,D, y E)(de Villiers, 2001)

Figura 15. Fotomicrografía electrónica del Virus del Papiloma Humano (VPH).



Tomado de http://www.virology.net/Big_Virology/BVDNApapova.html.

Las partículas virales de los virus del papiloma miden entre 52 y 55 nm; su cápside está compuesta por dos proteínas estructurales que conforman los 72 capsómeros: la principal (L1, del inglés *late*, tardío) y la proteína menor (L2); el virión no está encapsulado, es decir, carece de una membrana lipídica que lo envuelva. Su genoma que constituye cerca del 12% del peso total del virus y mide alrededor de 8000 pb. En dicho genoma, el contenido G-C (Guanina-Citosina) es de aproximadamente el 42%. Además, los ocho ORF's (del inglés, *open reading frames*, marcos de lectura abierta) se codifican y se transcriben a partir de una de las dos cadenas del DNA (Broker y Botchan, 1986, Fields, 1996).

Los virus del papiloma están ampliamente distribuidos en la naturaleza, aunque se reconocieron inicialmente en vertebrados. En la actualidad, se sabe que existen en humanos, gatos, conejos, caballos, perros, ovejas, cabras, venados, alces, primates inferiores, ratones de campo e incluso de anfibios, reptiles y aves. Se sabe que estos virus son altamente especie-específicos, es decir, que sólo infectan a una especie de hospedero. No obstante, se han identificado varios tipos e incluso subtipos virales en un mismo hospedero (Broker y Botchan, 1986, Fields, 1996).

Desde la década de los 70's, cuando H. zur Hausen (Vasconcelos, 1992) propuso que algunos virus eran capaces de inducir cáncer en humanos; a la fecha, se han descrito poco más de 80 tipos virus del papiloma humano de los cuales, más de 30 son capaces de infectar el tracto genital (CancerNet, 2000) y, puesto que no exhiben diferencias serológicas, se distinguen sólo por el grado de homología que presenta la secuencia de bases en los genes L1 (*L* del inglés: *late*, tardío), E6 (*E* del inglés *early*, temprano) y E7, por lo que se habla más bien de genotipos. La clasificación de estos virus se basa en la especie de origen y en el grado de homología que presenten sus genes L1, E6 y E7 (por ejemplo, VPH-16, es decir, virus del papiloma humano tipo 16); así, si un tipo viral no excede el 90% de homología entre sus genes, hablamos de un nuevo tipo, pero si la excede, entonces hablamos de un subtipo viral (Broker y Botchan, 1986, Fields, 1996).

Los virus del papiloma humano inducen verrugas que se presentan en muchos lugares y de muy distintas maneras, tanto en el ámbito morfológico como en el histológico. De manera general, se dividen en dos grandes categorías: los virus que infectan epitelios secos (por ejemplo, piel) y los que infectan epitelios mucosos (vías aéreas y tracto genital). La infección por virus del papiloma humano, necesita de un acceso directo a las células basales expuestas, tal vez, por una lesión en el epitelio. Se especula que el establecimiento de la infección depende de la activación del ciclo celular durante el periodo de cicatrización. Las "zonas de transformación" entre los epitelios columnar y escamoso de las mucosas nasal, faríngea y cervical (e incluso, los bordes de las cicatrices), son susceptibles de infectarse con estos virus.

La presencia de los virus del papiloma humano maduros, parece estar restringida a los queratinocitos diferenciados del epitelio, mientras que su presencia pasa desapercibida en las células inmaduras del estrato basal del mismo. Esto indica que los distintos estados del ciclo de vida requieren de factores específicos proporcionados sólo por los distintos estadios de diferenciación del tejido. La infección puede provocar desde hiperplasias hasta displasias que incluso pueden llegar a convertirse en neoplasias (cáncer). La penetración de células epiteliales transformadas (cancerígenas) a través de la membrana basal conduce al carcinoma invasor, lo que da origen a la metástasis y la consiguiente muerte del hospedero. Aunque en el epitelio exista ya DNA viral, esta infección suele ser asintomático clínicamente durante un largo período de tiempo, que puede ser desde meses hasta años (Broker y Botcham, 1986, Fields, 1996).

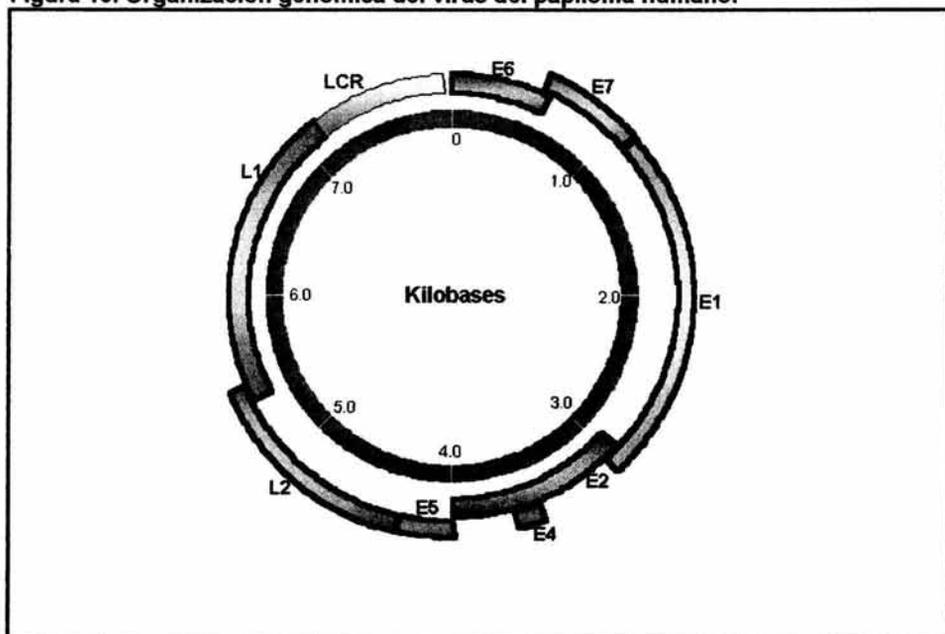
1. Organización genómica.

El genoma viral de estos virus (Figura 24) está organizado en tres regiones principales: dos regiones que codifican para proteínas tempranas *E* y *L* y, una región larga de control (*LCR*) no codificante (Park, 1995).

a. Región larga de control (LCR)

En el genoma de los VPH's, existe una región no codificante en dirección 5' a 3' entre las regiones que codifican para los genes tempranos y tardíos. Dicha región es llamada región larga de control o región reguladora río arriba (LCR o URR del inglés, *long control region* o *upstream regulatory region*), dado que en ella se encuentran localizados elementos reguladores tanto de la replicación como de la transcripción viral.

Figura 16. Organización genómica del virus del papiloma humano.



El extremo 3' de la LCR presenta una organización altamente conservada, y suele dividirse en tres regiones: distal, central y proximal. En la región distal, se encuentra el origen de la replicación del DNA viral, el cual se traslapa con la región de control de la transcripción del promotor temprano. Además de localizarse los sitios de unión a factores virales, se han identificado algunos otros sitios de unión a factores celulares de transcripción, entre los que se encuentran sitios de unión a

Sp1, Ap-1, YY1 o el receptor de glucocorticoides (Thierry, 1992; May, 1994; Bauknecht, 1995; Medina, 1996).

La porción central del extremo 3' de la LCR contiene un elemento potenciador transcripcional (enhancer), que se activa sólo en las células epiteliales. Puesto que no se ha observado interacción de esta región con proteínas virales, se deduce que son factores netamente celulares los que interactúan con este elemento, que podría ser un factor de transcripción específico de queratinocitos (KRF).

La región proximal contiene tres sitios de unión para el factor de transcripción viral E2 (E2BS's). Dichos sitios de unión es una serie de secuencias palindrómicas consenso ACC(N)₆GGT, encargadas de modular la replicación del genoma viral (Androphy, 1987; Moskaluk, 1987). Los dos sitios más proximales (E2BS#1 y E3BS#2), están estrechamente flanqueados en 3' por la caja TATA y en 5' por el sitio Sp1. La región mínima que se requiere para la replicación del DNA, es un fragmento de 90 pares de bases que comprende los tres E2BS's y las secuencias que intervienen en la posición del sitio de unión para el iniciador de la replicación viral E1, que se encuentra flanqueado por dos regiones ricas en adenina y timina (Chiang, 1992; Rem, 1992; Demeret, 1995).

La porción 5' de la LCR, contiene el sitio de poliadenilación y un elemento de unión para la porción viral del E2 (E2BS#4). No se ha definido el papel de esta región claramente, aunque pudiese estar involucrada en los RNAm's tardíos (Desaintes, 1996).

b. Región temprana (E).

La región temprana E, se encuentra ubicada río abajo de la LCR y contiene seis ORF's denominados E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Los ORF's son fragmentos de

DNA que funcionan como unidades transcripcionales capaces de codificar para una proteína (Park, 1995).

La fase replicativa del ciclo de vida de los papilomavirus ha sido difícil de estudiar debido a su estrecha relación con el programa de diferenciación terminal del epitelio. La transcripción de estos virus es muy compleja debido a la presencia de muchos promotores, patrones de empalme (*splicing*) múltiples y alternados y la producción diferencial de los distintos RNAm's en las distintas células.

- E1.

El ORF E1, pertenece al gen más grande del genoma de los virus del papiloma; este gen, está relativamente bien conservado en ellos, su producto génico, la proteína E1, presenta similitudes estructurales con el antígeno T grande de los poliomavirus (Clertant, 1984). La mayoría de los estudios concernientes al papel de E1 en la replicación del DNA viral se han enfocado al sistema modelo del virus de papiloma bovino tipo 1 (BPV-1) y, se han extrapolado hacia los VPH con muy pocas modificaciones (Desaintes, 1996).

E1, es una fosfoproteína nuclear de 68 a 76 kD (666-650 residuos aminoácidos) dependiendo del tipo de virus de papiloma que se trate, que interviene directamente en la replicación del DNA viral. La proteína actúa como ATPasa y como helicasa dependiente de ATP, que cataliza el desenrollamiento del DNA (Hughes, 1993; Seo, 1993; Liu, 1995). Esta proteína se une específicamente al origen de la replicación de los virus del papiloma (Thorner, 1993; Ustav, 1991; Liu, 1995; Bream, 1993; Holt, 1994; Benson, 1995).

E1, interactúa con la DNA polimerasa α -primasa, atrayéndola hacia el origen de la replicación viral, una región rica en A/T (Gillette, 1994). Además de esto, presenta la capacidad de moverse a lo largo del DNA en dirección 3'→5' (Seo, 1993; Bonne-Andréa, 1995a y b). En BPV-1, se une al origen de la

replicación en forma de un oligómero, formando una estructura anular trimérica (Sedman, 1996), por lo que se especula que los VPH's forman estructuras similares ya que la unión de E1 al DNA, requiere de ATP que también es indispensable para la formación de los oligómeros.

E1, es capaz tanto de unirse al origen de la replicación como de interactuar con la proteína E2. En los VPH's 16 y 33, se ha determinado que el dominio de unión a E2, se encuentra en el extremo C-terminal de la proteína (Liu, 1995; Bream, 1993; Holt, 1994; Benson, 1995). Además, se ha demostrado que E1 interviene también en la estimulación de la actividad transcripcional de E2 (Piccini, 1995).

- E2.

El ORF E2 de virus del papiloma humano, codifica para una proteína de 45 a 48 kd (dependiendo del tipo de VPH) que se une en forma de dímero al DNA viral en una secuencia palindrómica específica ACC(N₆) GGT (Androphy, 1987; Moskaluk, 1988; Hines, 1998), localizada en la LCR del genoma viral. Esta proteína presenta tres dominios estructurales en dos de ellos, las secuencias génicas están altamente conservadas: en el extremo amino terminal (N-terminal) y carboxilo terminal (C-terminal) y una región de unión muy poco conservada, de longitud variable llamada región de bisagra (Ham, 1991). La región bisagra, que corresponde a la región central de la proteína, contiene numerosos residuos de prolina y sirve como punto de unión para los otros dominios protéicos (Ham, 1991; Desaintes, 1996).

El dominio N-terminal, contiene la región ácida de la proteína pues está formada en su mayoría por residuos aminoácidos de naturaleza ácida, que forman dos largas α -hélices anfipáticas, seguidas por una región de hojas β -plegadas, directamente relacionadas con la activación de la replicación y la transcripción virales (Ham, 1991; Hedge, 1992; Hedge, 1998). El dominio C-terminal, contiene

una estructura de barril β , rico en residuos aminoácidos de naturaleza básica, responsables de la dimerización de la proteína (Hedge, 1992) y, dos α -hélices, que interactúan con el sitio de unión a DNA de E2 (E2BS, del inglés *E2 binding site*) en la secuencia palindrómica ubicada en el surco mayor del DNA viral.

El E2BS, conformado por esta secuencia palindrómica, se presenta en varias copias en la LCR de todos los virus del papiloma: los VPH's contienen sólo cuatro sitios de unión en posiciones bien conservadas, mientras que en el BPV-1 se encuentra repetido 7 veces (Rank, 1995).

La proteína E2, interviene tanto en la expresión como en la represión de los genes virales (Fields, 1996; Terry, 1997; Vernon, 1997; Hines, 1998; Hedge, 1992; Dowhanick, 1995; Hedge, 1998; Veress, 1999). En los VPH's, E2 actúa como represor de la transcripción. La represión depende de la interacción entre E2 y la E2BS a la que se une. La unión de E2 al E2BS#1, que es el más cercano al promotor viral, dificulta la interacción de la proteína TBP (del inglés, TATA box binding protein) con la caja TATA, evitando así el ensamblaje del complejo de iniciación de la transcripción (Dostatni, 1991). La unión de E2 a los E2BS#2 y E2BS#3, también contribuyen a la represión de la transcripción, aunque no en todos los tipos celulares. La unión de E2 al E2BS#2, desplaza a Sp1 de su principal sitio de unión, hecho que puede afectar la transcripción, dependiendo de si se puede compensar o no la activación de Sp1 (Demeret, 1994; Dong, 1994; Tan, 1994). La unión de E2 al E2BS#4, activa la transcripción viral, lo que se favorece al encontrar E2 en concentraciones mínimas en la célula hospedera; además, aunque la afinidad de los cuatro E2BS es relativamente equivalente, la estabilidad de la unión E2-E2BS#4, es mucho más alta que con respecto a los otros tres E2BS (Desaintes, 1996).

Uno de los principales papeles de E2 en la replicación es dirigir a E1 hacia el origen de la replicación (Piccini, 1995). Esta función es muy importante considerando la poca afinidad de E1 por su secuencia blanco (Sedman, 1995).

Una vez que se ha iniciado la replicación del DNA viral, puede que no se requiera de la presencia de E2 para la síntesis de nuevas cadenas (Liu, 1995). Además, se ha mencionado que E2 también puede intervenir en el proceso de replicación a través de su interacción con el factor RPA, liberando la represión mediada por los nucleosomas durante la replicación del DNA viral (Li, 1993).

- E4.

El ORF E4 del virus del papiloma humano, se localiza en la región temprana, aunque se expresa como un gen tardío con un papel en la infección productiva. Su producto génico, es una proteína de 10 a 34 kD de localización citoplasmática en la célula hospedera. Se ha demostrado que la proteína E4 no se requiere para la transformación o el establecimiento episomal del DNA viral (Breitburd, 1987; Doorbar, 1986).

En los papilomas inducidos por VPH, la proteína E4 se localiza principalmente en las capas de células diferenciadas del epitelio, es decir, que es más probable que E4 tenga un papel en la infección productiva, interrumpiendo el proceso normal de diferenciación a favor de la maduración del virión (Doorbar, 1986), y/o de la replicación del DNA viral (Breitburd, 1987).

Al unirse al citoesqueleto de citoqueratina de la célula hospedera, por el extremo N-terminal, lo colapsa, indicando con ello que E4 ayuda a la liberación de los viriones de una célula infectada (Doorbar, 1991; Roberts, 1993; Rogel-Gaillard, 1993).

- E5.

El ORF E5, es un gen altamente conservado en todos los virus del papiloma (VP's) (Kulke, 1991). Este gen codifica para una proteína de 7 a 10 kD, dependiendo del tipo de VP del que se trate (Myers, 1997), que estructuralmente,

está compuesta por dos dominios estructurales: uno muy hidrofóbico en el extremo N-terminal y uno hidrofílico en el extremo C-terminal (Shlegel, 1986; Burkhardt, 1987). Esta proteína se encuentra unida a las membranas intracelulares del aparato de Golgi y del retículo endoplásmico en forma de dímero transmembranal (Burkhardt, 1989; Burnett, 1992) y, contiene dos residuos de cisteína que se requieren tanto para la transformación como para la dimerización (Burkhardt, 1987; Horwitz, 1988).

E5, no posee actividad enzimática intrínseca, por lo que transforma indirectamente al alterar la actividad de las proteínas de la membrana involucradas en la proliferación celular (Fields, 1996). *In vitro*, se ha observado actividad transformante en la proteína E5 de VPH-16. En fibroblastos y en queratinocitos de ratón, induce algunas alteraciones transformantes (Leechanachai, 1992; Leptak 1991; Straight, 1993), mientras que en queratinocitos humanos, incrementa la capacidad de proliferación (Storey, 1992) y la síntesis de DNA celular de la misma forma en que lo hace el EGF (Straight, 1993). Aunque no se ha observado expresión génica de E5 en los cánceres VPH positivos, es plausible que esta proteína participe en el proceso de iniciación carcinogénica (Fields, 1996).

- E6.

El ORF E6 de VPH-16, codifica para una proteína de 16 a 19 kD, presente en niveles muy bajos tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula hospedera (Myers, 1997).

El producto génico de E6, es una proteína que contiene cuatro motifs Cys-X-X-Cys, capaces de unirse al zinc, característica que, por cierto, presentan algunos transactivadores transcripcionales (Barbosa, 1989; Grossman, 1989a; Grossman, 1989b). E6, captura e inactiva al gen supresor de tumores p53, favoreciendo su degradación (Werness, 1990). p53, actúa como transactivador

transcripcional secuencia-específico que regula el ciclo celular y como agente supresor de tumores (Funk, 1992; Kern, 1992), además, promueve el arresto del ciclo celular al favorecer la inhibición de las cdk's por parte del p21 (El-Diery, 1993; Harper, 1993; Xiong, 1993).

En VPH-16, E6 captura indirectamente a p53, mediante la proteína E6AP (del inglés, *E6 associated protein*) e induciendo su degradación a través de la vía de la ubiquitina (Huibregtse, 1991; Huibregtse, 1994; Scheffner, 1990). En altos niveles, p53 conduce al arresto del ciclo celular o a la apoptosis, es cual es un mecanismo de defensa celular para permitir la reparación del DNA antes de iniciar un nuevo ciclo de replicación del DNA (Fields, 1996).

Además de la anterior vía, existe otro posible mecanismo por el que E6 puede inhibir las funciones reguladoras normales de p53, pues se ha demostrado que E6 de VPH-18 puede romper el complejo p53-DNA y, subsecuentemente, desregular la transactivación transcripcional de p53. Esta desregulación es independiente de la ubiquitinización de p53 (Park, 1995).

- E7.

El ORF E7, codifica para una fosfoproteína de 10 a 14 kD, dependiendo del tipo viral del que se trate (Myers, 1997). Esta proteína se localiza generalmente en el núcleo de la célula hospedera; es capaz de unirse al zinc (Miyasaka, 1991; Takami, 1992) y al cadmio (Pahel, 1993), a través de dos motifs Cys-X-X-Cys, localizados en el extremo C-terminal de la proteína (Munger, 1992).

Las regiones altamente conservadas de esta proteína, son capaces de unirse al producto génico del gen RB, que es un gen supresor de tumores (De Caprio, 1988; Dyson, 1989; Whyte, 1988). La fosforilación de la proteína retinoblastoma, es regulada por el ciclo celular: la desfosforilación se da en G₀ y en G₁, mientras que la fosforilación se lleva a cabo en S, G₂ y M. pRB, se

fosforila en sus múltiples residuos de serina a través de las cdk's (del inglés, *cyclin dependent kinases*), en el límite de G₁/S y se mantiene fosforilado hasta M tardía, cuando comienza a desfosforilarse a través de una fosfatasa específica (Fields, 1996). Puesto que pRB actúa como regulador negativo del ciclo celular, la forma fosforilada representa la proteína activa con respecto a su capacidad de inhibir la progresión del ciclo celular. E7, se une preferencialmente a la forma desfosforilada de pRB, lo que conduce a su inactivación y la consecuente progresión del ciclo celular a la fase S (Cobrinik, 1992).

c. Región tardía (L).

La región tardía L (del inglés late, tardío, retrasado), se encuentra ubicada río abajo de la LCR y contiene sólo dos ORF denominados L1 y L2. Los ORF's se transcriben y traducen, exclusivamente en las células más diferenciadas del epitelio, su principal función es conformar la cápside de los viriones maduros en la infección productiva (Fields, 1996).

- L1.

El ORF L1 codifica para una proteína de 55-60 kD que está bien conservada en todos los VP's. Esta proteína es el componente principal de la cápside viral y representa cerca del 95% del peso de proteína en estos virus. De todas las proteínas de los VP's esta es la más antigénica de todas, se fosforila fácilmente y no se une al DNA. Entre otras características, presenta la capacidad de glicosilarse y de entrecruzarse a través de puentes disulfuro (Orth, 1978; Nakai, 1987), además, es capaz de autoensamblarse, precisamente es esta capacidad la que se ha aprovechado para producir partículas virales (VLP's, virus like particles)(Hagensee, 1993; Kirnbauer, 1992; Rose, 1993; Zhou, 1991).

- L2.

El ORF L2 del genoma de los VP's, codifica para una proteína de 49-70 kD. Esta proteína, es el componente menor de la cápside viral, se fosforila fácilmente y presenta la capacidad de unirse al DNA, contrariamente a L1, no es capaz de autoensamblarse y es muy poco conservada entre los VP's. (Danos, 1984; Fields, 1996; Myers, 1997).

Tabla 1. Características estructurales y funcionales de las proteínas de los VPH.

Proteína	Peso Molecular kD	Función	Localización celular
E1	68-76	Replicación viral	Nuclear
E2	45-48	Regulación transcripcional	Nuclear
E4	10-34	Liberación del virión	Citoplasmática
E5	7-10	Proliferación celular	Citoplasmática
E6	16-19	Inmortalización y malignización *	Nuclear y citoplasmática
E7	10-14	Inmortalización y malignización *	Nuclear y citoplasmática
L1	55-60	Composición cápside viral	Citoplasmática
L2	49-60	Composición cápside viral	Citoplasmática

Tomado de Fields (1996) y Myers (1997). *, se refiere a la inmortalización y malignización de la célula hospedera.

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer cervicouterino es la segunda neoplasia más frecuente a escala mundial, las estimaciones más conservadoras nos dicen que para el año 2000, el número de muertes provocadas por ésta enfermedad ascenderán a 276 000. En los países desarrollados, el 80% de los casos de cáncer cervical son detectados tempranamente mediante la prueba de citología exfoliativa implementada por Papanicolaou y Traut en 1921. Sin embargo, estos países sólo presentan alrededor del 20% de los casos en el mundo, la mayor parte de ellos (80%) se presenta en los países en vías de desarrollo. En México, el cáncer cervical constituye la primera causa de mortalidad femenina debida a tumores malignos. Los datos epidemiológicos revelan, que a pesar de la implementación de programas de detección oportuna del cáncer, este problema ha crecido con el paso de los años. De todo ello, podemos apreciar la necesidad de implementar nuevos mecanismos de detección con el fin de detener a tiempo las lesiones precursoras del cáncer cervical. En este rubro, la Colposcopia, desarrollada en 1925 por Hinselman y con una historia de aproximadamente 20 años de aplicación en el marco de salud pública en la Ciudad de México, se ha convertido en una técnica de fácil realización y accesibilidad para una gran cantidad de personas. A pesar de ello, la controversia acerca de su efectividad, se ha visto fortalecida por la carencia de estudios que apoyen la validez y efectividad del diagnóstico colposcópico. Por todo lo anterior, resulta de gran importancia conocer el grado de certeza del diagnóstico colposcópico.

V. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar mediante ensayos moleculares la validez del diagnóstico colposcópico de la infección por virus del papiloma humano.

Objetivos Particulares

1. Determinar la presencia de DNA del virus del papiloma humano en la población de estudio mediante la amplificación de secuencias generales de DNA viral mediante PCR.
2. Determinar la presencia de DNA de VPH en la población de estudio mediante la técnica de Captura de Híbridos.
3. Amplificar secuencias específicas del virus del papiloma humano de tipo 16 (VPH-16) en la población de estudio mediante PCR.
4. Determinar la integridad del gen E2 del VPH-16 en las biopsias estudiadas.
5. Evaluar la importancia de la Colposcopia mediante el seguimiento postratamiento de la población estudiada.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Material humano.

En el presente estudio se analizaron 100 pacientes de una población abierta provenientes de diferentes regiones del país, referidas al Centro Nacional de Clínicas de Displasias (CENACLID), en el Hospital General de México de la Secretaría de Salud en la Ciudad de México.

También fue practicado un cuestionario que incluyó edad actual, edad al inicio de la vida sexual activa, número de gestaciones, uso de anticonceptivos hormonales y tabaquismo en cada una de las pacientes.

B. Colposcopia.

Cada una de las pacientes fue inspeccionada por un colposcopista experto tras la aplicación de una solución de ácido acético al 15%, quien tras esperar de 1 a 3 minutos después de la aplicación visualizó el cérvix con un colposcopio tipo Zeiss OPMI-1 (Carl Zeiss Incorporation, Oberkochen, Alemania). La visualización del cérvix se hace con el fin de detectar zonas de epitelio acetoblanco que de acuerdo con la Federación Internacional de Colposcopia y Patología Cervical, son zonas de presencia del virus del papiloma humano, principal factor de desarrollo del cáncer cervical. Las características de estas zonas (color, transparencia, contorno y presencia de vasos sanguíneos) son claves para determinar el tipo de lesión que presenta una paciente determinada: infección por virus del papiloma humano (IVPH), neoplasia intraepitelial cervical (NIC) o carcinoma cervical (CaCe).

Las biopsias cervicales, se toman de las zonas de epitelio acetoblanco por medio de pinzas para biopsia como la que se observa en la figura 4. Las muestras se colocan en microtubos para microcentrifuga que contenía PBS estéril (ver

apéndice B), para su conservación. Las biopsias fueron procesadas el mismo día de su botención.

C. Digestión del tejido cervical.

La extracción del DNA de las biopsias cervicales se hace a partir de una modificación del método reportado por Banerjee en 1995, debido a que en este caso se trabaja con tejido fresco. A cada una de las muestras de tejido cervical se le agregan 400 μ l de una solución de proteinasa K con una concentración de 16.5 mg/ml y se mantiene en incubación a 42°C durante una noche (aproximadamente 12 horas). Aquellas muestras que al día siguiente no han completado su digestión se incuban a 55°C durante 3 horas. Una vez digerido el tejido, se procede a centrifugar a 6000 r.p.m. durante 5 minutos y se colecta el sobrenadante en un nuevo tubo. Estos tubos se incuban durante 10 minutos a 94°C y se trasladan inmediatamente después a un baño de hielo durante 10 minutos con el fin de inactivar la proteinasa K por medio de choque térmico.

D. Extracción y purificación de DNA.

La purificación de DNA, es un método que tiene como objetivo remover las proteínas de una solución acuosa de ácido desoxirribonucleico y restos celulares.

1. Extracción de DNA.

La purificación de ácidos nucleicos, es el método que tiene como objetivo remover las proteínas de una solución acuosa de ácidos nucleicos. La extracción de DNA con fenol:cloroformo, se basa en el hecho de que la desproteinización es mucho más eficiente cuando se utilizan dos solventes orgánicos distintos en lugar de uno. Además, la extracción subsecuente con cloroformo retira cualquier traza de fenol durante la preparación del ácido nucleico.

Este proceso consiste en tres etapas: Se agrega un volumen igual al obtenido del proceso anterior de fenol puro (pH 8.0), se agita vigorosamente con un vórtex durante 5 minutos, se centrifuga durante 3 minutos a 14 000 r.p.m. a temperatura ambiente y se recupera la fase superior en un nuevo tubo. A este nuevo tubo, se le agrega $\frac{1}{2}$ volumen de fenol y $\frac{1}{2}$ volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (ver Apéndice B), se agita vigorosamente durante 5 minutos, se centrifuga durante 3 minutos a 14 000 r.p.m. y se colecta la fase superior en un nuevo tubo. A este último, se le agrega un volumen igual de cloroformo:alcohol isoamílico, se agita vigorosamente durante 5 minutos, se centrifuga a 14 000 r.p.m. durante 3 minutos y se colecta la fase superior en un nuevo tubo (Figura15).

Nota: Es importante mencionar que después de la centrifugación, se forman 3 fases: la inferior que contiene el disolvente orgánico, en la fase intermedia se presenta gran cantidad de restos celulares y, la fase superior que contiene DNA en solución. Sólo se recupera con mucho cuidado esta última fase, procurando mover sólo lo indispensable los tubos para no arrastrar los contaminantes de la fase intermedia.

2. Purificación de DNA.

La precipitación de DNA se realiza con la solución acuosa resultante del proceso anterior y etanol al 100% y al 70%. Se agrega un volumen igual a $\frac{1}{20}$ de NaCl 4M y $2\frac{1}{2}$ volúmenes de etanol al 100% frío (almacenado a -20°C), con respecto al volumen obtenido del proceso anterior y se deja precipitar durante 2 días (lo que mejora el rendimiento) a -20°C ; después, se centrifuga durante 1 hora a 14 000 r.p.m. a 4°C y se decanta con mucho cuidado el sobrenadante. Luego, se hacen tres lavados con 750 μl de etanol frío al 70% (almacenado a -20°C) y centrifugando inmediatamente a 14 000 r.p.m. durante 5 minutos y decantando cuidadosamente el sobrenadante de cada uno de los tres lavados con mucho cuidado. Por último, se dejan secar los tubos a temperatura ambiente y se agregan 50 o 100 μl de buffer TE (ver Apéndice B), en función del tamaño de la pastilla que se obtiene y de mezcla ligeramente para resuspenderlo.

Nota: Es importante observar la posición de la pastilla de DNA para evitar perderla al decantar el etanol, lo que se hace con mucho cuidado tratando de evitar que se desprege el DNA de la pared del tubo.

2. Cuantificación de DNA.

La cuantificación espectrofotométrica del DNA, se basa en la medición de la cantidad de radiación ultravioleta que absorben las bases del DNA y se procede de la siguiente manera: Se hizo una dilución 1:200 del DNA obtenido de los pasos anteriores (4 μ l de solución de DNA y 796 μ l de agua destilada), para obtener un volumen total de 800 μ l. De esta dilución, se tomó la lectura de absorción a dos diferentes longitudes de onda: 260 nm y 280nm en un espectrofotómetro (DU[®]-65 Spectrophotometer Beckman). La lectura a 260 nm, permite calcular la concentración del DNA en la muestra. Un OD (densidad óptica) de 1, corresponde a aproximadamente 50 μ g/ml de DNA bicatenario, 40 μ g/ml de DNA de cadena sencilla (o de RNA) y a 20 μ g/ml de oligonucleótidos monocatenarios. La relación entre las lecturas a 260 nm y a 280 nm (OD_{260}/OD_{280}) proporciona un estimado de la pureza del DNA. Las preparaciones de DNA y RNA tienen valores de OD_{260}/OD_{280} entre 1.8 y 2.0, respectivamente. Si existe contaminación con proteínas o con fenol, la concentración es significativamente menor que los valores arriba mencionados (Sambrook, 1989).

La concentración de DNA en las muestras se determina mediante la fórmula:

$$[\text{DNA}] \text{ (ng/}\mu\text{l)} = (\text{OD a 260 nm}) (\text{factor de dilución})(\text{OD del DNA})$$

En donde:

OD = densidad óptica

Factor de dilución: 200

OD del DNA = 50

Por otro lado, la presencia de contaminantes protéicos se determina mediante la relación:

$$[\text{proteínas}] = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

F. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Las condiciones de la reacción varían en función del tamaño del fragmento que se desea amplificar y el tipo de polimerasa utilizada, sin embargo, los reactivos necesarios para la amplificación no suelen cambiar. Estos reactivos se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción de PCR.

Reactivos	Volumen por tubo de reacción (μl)
MgCl ₂ 10 mM	3.0
PCR-Buffer 10x	2.0
dNTP's 2 mM	2.0
Oligonucleótido 1 (forward) 50 pM	0.4
Oligonucleótido 2 (reverse) 50 pM	0.4
Taq-pol 5 U/ μl	0.2
DNA	500 ng
H ₂ O	La necesaria
Volumen total	20 μl

A pesar de que el volumen final de reacción es de 20 μl , en algunos casos no se agregó agua debido a la baja concentración del DNA obtenido.

La determinación de la T_M para los oligonucleótidos del presente proyecto se calcula con la siguiente fórmula:

$$T_M = ((2(A + T)) + (4(G + C)) - 5)$$

En donde:

$T_M^\circ C$ = temperatura óptima de apareamiento de oligonucleótidos en grados centígrados.

A = es el número de adeninas en la secuencia del oligonucleótido

T = es el número de timinas en la secuencia del oligonucleótido

G = es el número de guaninas en la secuencia del oligonucleótido

C = es el número de citosinas en la secuencia del oligonucleótido

La amplificación del fragmento deseado se lleva a cabo a 72°C, debido a que es la temperatura óptima de desempeño de la polimerasa. El número de ciclos varía en un rango que va de los 20 a los 30 ciclos por reacción de amplificación.

1. Determinación de la integridad del DNA: PCR β -globina humana

Para asegurar que el DNA obtenido de los procesos anteriores es útil para la PCR se evalúa su integridad estructural por medio de una amplificación de prueba para un segmento de la β -globina humana. Dicha amplificación, se llevó a cabo con los oligonucleótidos PC03 (5' ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC 3') y PC04 (5' CAA CTT CAT CCA CGT TAC C 3') que codifican para un fragmento de 110 pares de bases (pb) localizado entre las bases 955 y 1064 del gen de la β -globina humana (Tabla 3) (Saiki, 1986). En cada tubo de reacción se agregan 500 ng de DNA de cada una de las muestras. Sólo en esta reacción, se utilizó agua destilada como control negativo de la amplificación.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para las amplificaciones por PCR.

Oligonucleótidos	Localización del oligonucleótido	Tamaño del amplicón	Secuencia 5' a 3'
β -globina humana ^a PC03 PC04	955 1064	110pb	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
VPH L1 ^b Gp5 Gp6	6624 6746	150 pb	TTG TTA CTG TGG TAG ATT AC GAA AAA TAA ACT GTA AAT CA
VPH L1 ^c My 09 My 11	6722 7170	450 pb	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC
VPH-16 LCR ^d Forward Reverse	7478 7842	364 pb	GGG GTA CCT CGG TTG CAT CTT GGC GGT CTA GAC TTG CAC ACA CCC ATG T
VPH-16 E2 ^e Forward Reverse	2810 3836	1026 pb	ATG AAA ATG ATA GTA CAG AC CCA GTA GAC ACT GTA ATA G

a, corresponden a los oligonucleótidos reportados por Saiki en 1985. b, corresponden a los oligonucleótidos universales Gp5/6 reportados por Karlsen en 1996. c, corresponde a los oligonucleótidos reportados por Manos en 1989. d, son los oligonucleótidos reportados por Ho (1991). e, corresponde a los oligonucleótidos que amplifican en gen E2 completo del VPH-16 por Rocha-Zavaleta (1996).

Las temperaturas de reacción para la amplificación de este segmento de la β -globina humana son: un precalentado a 95° C durante 5 minutos, 95° C durante 30 segundos para la separación de las cadenas del DNA (desnaturalización), 30 segundos a 55° C para el apareamiento de los oligonucleótidos (alineamiento) y, 72° C durante 60 segundos para la replicación del segmento de DNA (elongación), repetido durante 30 ciclos en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2 400. Finalmente al producto de reacción se le incuba y se mantiene a 4° C hasta retirar del termociclador (Tabla 4).

Tabla 4. Temperaturas de reacción para las amplificaciones por PCR.

Etapa de la PCR	β -globina humana	L1 VPH Gp5/6	L1 VPH My 09/11	VPH-16 LCR	VPH-16 E2
Separación de bandas	95° C	95° C	95° C	95° C	95° C
Alineación de oligonucleótidos	55° C	43° C	45° C	54° C	48° C
Amplificación de segmentos	72° C	72° C	72° C	72° C	72° C
Número de ciclos	30	30	30	30	30

En todos los casos se llevó a cabo un precalentado a 95° C y una prolongación de la amplificación de los segmentos a 72° C, también de 5 minutos.

2. Determinación de la presencia de DNA de VPH.

La presencia de DNA viral se determina mediante la amplificación de un par de fragmentos del gen L1 con los oligonucleótidos generales Gp5/6 y los oligonucleótidos generales degenerados My09/11.

a. PCR Gp5/6.

Los oligonucleótidos generales Gp5/6, amplifican un fragmento del gen L1 de los VPH comprendido entre los sitios 6627 y 7842. Ambos oligonucleótidos, Gp5 (5' TTG TTA CTG TGG TAG ATT AC3') y Gp6 (5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CA 3'), tienen una longitud de 150 pares de bases del genoma de los VPH's de los siguientes 11 tipos: 1a, 6, 8, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32 y 33 (Tabla 3) (Snijders, 1990).

La composición de la mezcla de reacción es similar a la reportada para la amplificación de β -globina (Tabla 2), excepto por los oligonucleótidos que en esta ocasión se trata de los Gp 5/6. En este caso, para el control positivo se utiliza DNA extraído de la línea celular humana SiHa, que contienen aproximadamente una copia del genoma del VPH-16. Como control negativo, se utiliza la línea celular B16F0, que es una línea celular murina cuyo proceso de malignización no está asociado a la infección por VPH.

Las temperaturas de reacción para la amplificación de este segmento del gen L1 del virus del papiloma humano son: un precalentado a 95° C durante 5 minutos, 95° C durante 30 segundos para la separación de las cadenas del DNA (desnaturalización), 30 segundos a 43° C sólo varía para el caso del apareamiento de los oligonucleótidos (alineamiento) y, 72° C durante 60 segundos para la replicación del segmento de DNA (elongación), repetido durante 30 ciclos en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2 400. Finalmente al producto de reacción se le incuba y se mantiene a 4° C hasta retirar del termociclador (Tabla 4).

b. PCR My 09/11.

Los oligonucleótidos generales My09/11, permiten la amplificación de un fragmento de aproximadamente 450 pb de longitud del gen L1 del DNA de los VPH's comprendido entre las bases 6 722 y 7 170 del genoma viral. La secuencia de bases de estos oligonucleótidos se considera degenerada al permitir la amplificación de segmentos de gran homología de 5 tipos de VPH's, entre los que se encuentran 6, 11, 16, 18 y 33. Dicha secuencia es la siguiente: 5' CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC 3' para My 09 (reverse), mientras que para My 11 (forward), es 5' GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG 3' (Tabla 4).

Las temperaturas de reacción para la amplificación con los oligonucleótidos My son similares a las descritas para la amplificación Gp 5/6 (Tabla 4), a

excepción de la temperatura de alineamiento de oligonucleótidos que en este caso es de 45° C.

3. Amplificación de secuencias específicas de la LCR de VPH-16.

Para este proyecto, se amplifica una secuencia específica VPH-16 en las biopsias cervicales; esto se realiza mediante la amplificación de un fragmento de la región larga de control (LCR, del inglés, *long control region*) del virus con los oligonucleótidos VPH-16 LCR forward (5' GGG GTA CCT CGG TTG CAT GCT TTT TGG C 3') y VPH-16 LCR reverse (5' GGT CTA GAC GGT TTG CAC ACA CCC ATG T 3') que amplifican un fragmento de 364 pb localizado entre las bases 7 458 y 7 861 del genoma viral (Tabla 3) (Ho, 1991).

Las temperaturas de reacción son las mismas que se han manejado para β -globina humana (Tabla 4), a excepción de la temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos que en este caso es de 54°C.

4. Determinación de la presencia e integridad del gen E2 de VPH-16.

La determinación de la presencia del gen E2 en el DNA viral del VPH-16 en las biopsias cervicales se realiza mediante su amplificación con los oligonucleótidos VPH-16 E2 forward (5' ATG AAA ATG ATA GTA CAG AC 3') y VPH-16 E2 reverse (5' CCA GTA GAC ACT GTA ATA G 3'), que amplifican un fragmento de 1 022 pb comprendido entre las bases 2 725 a 3 852 del genoma de VPH-16 que incluye el gen E2 completo (Tabla 3) (Rocha-Zavaleta, 1997).

Las temperaturas de reacción para la amplificación del gen E2 completo del virus del papiloma humano tipo 16 son: un precalentado a 95° C durante 5 minutos, 95° C durante 30 segundos para la separación de las cadenas del DNA (desnaturalización), 30 segundos a 48° C para el apareamiento de los oligonucleótidos (alineamiento) y, 72° C durante 60 segundos para la replicación

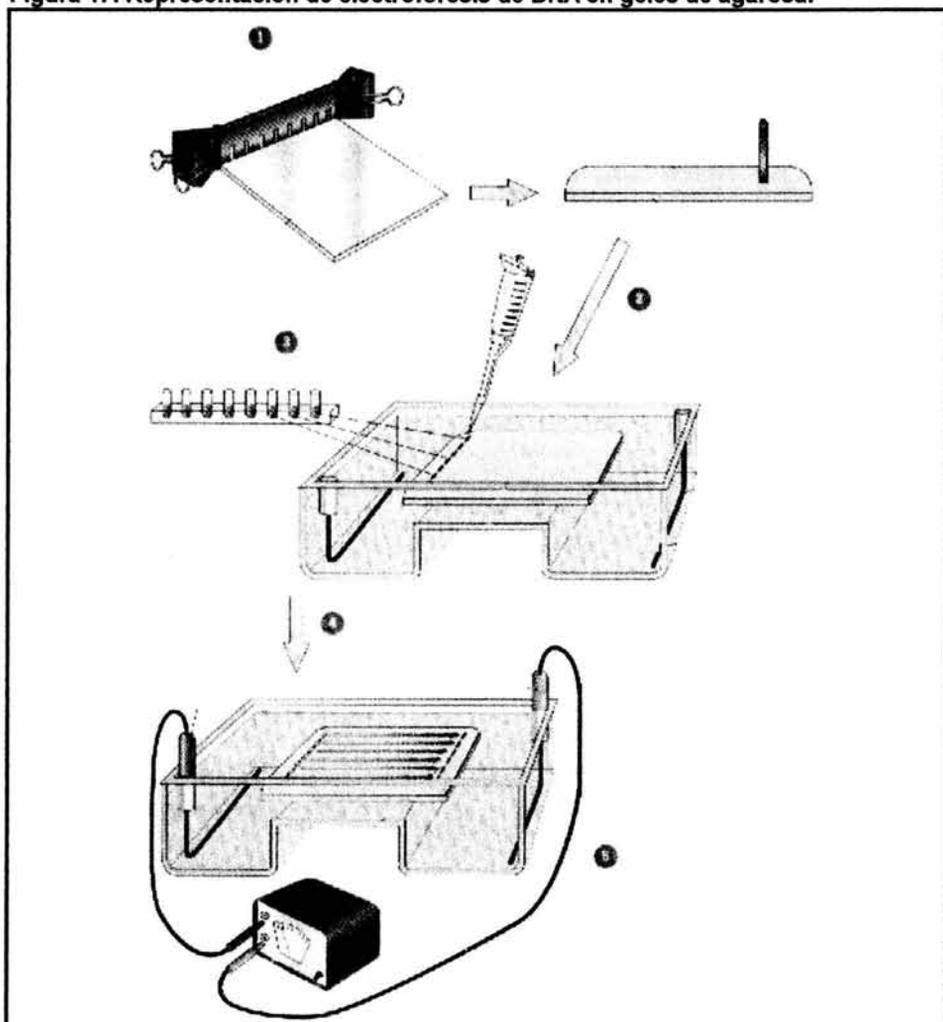
del segmento de DNA (elongación), repetido durante 30 ciclos en un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2 400. Finalmente al producto de reacción se le incubaba y se mantiene a 4° C hasta retirar del termociclador (Tabla 4).

G. Electroforesis en geles de agarosa.

Un gel es una malla compleja de moléculas poliméricas y dado que el DNA tiene una carga neta negativa, en un campo eléctrico migran a través del gel a velocidades que dependen directamente de sus tamaños: una molécula pequeña de DNA migra más rápidamente que una molécula grande. La electroforesis en geles de agarosa se lleva a cabo frecuentemente con fragmentos de DNA de tamaños conocidos, los cuales permiten la determinación segura del tamaño de una molécula de DNA desconocido por interpolación. Una de las ventajas de este tipo de electroforesis es que las bandas de DNA pueden ser fácilmente detectadas con gran sensibilidad cuando las bandas del gel se tiñen con un colorante intercalante como el bromuro de etidio, que fluoresce cuando se ilumina del gel con luz ultravioleta (Old RW, 1985; Sambrook, 1989; Valcárcel y Gómez. 1990).

Preparación del gel de agarosa. Se pesa la agarosa necesaria para preparar el gel a la concentración deseada (2% para β -globina y Gp y, 1% para My, LCR y E2). Se le agrega la cantidad deseada de buffer TBE (Apéndice B), en un matraz Erlenmeyer de uso exclusivo para la preparación de estos geles, pues se le adiciona Bromuro de Etidio de 100 mg/100 ml para obtener una concentración final de 6 μ g/100 ml de agarosa. Se calienta en horno de microondas a intervalos de 20 segundos agitando ligeramente entre cada calentamiento hasta disolverla. Se vacía en el molde de la cámara de electroforesis y se coloca el peine para la formación de los pozos del gel, solidificado el gel, se agrega buffer TBE hasta cubrir el gel dentro de la cámara de electroforesis (Gibco Horizon® 58 BRL Life Technologies Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus), se colocan en cada pozo 8 μ l del producto de PCR y 2 μ l de gel-loading

Figura 17. Representación de electroforesis de DNA en geles de agarosa.



1. La agarosa fundida se vacía en un molde y se coloca el peine para formar los pozos que se llenarán con las muestras de DNA. 2. Se retira el peine de la agarosa y se transfiere a una cámara de electroforesis y se añade el buffer que ayudará en la conducción de la corriente eléctrica. 3. Se transfieren las soluciones que contienen las muestras de DNA amplificadas. 4. Se conecta a una fuente de poder y comienza la electroforesis. 5. Se visualiza el resultado de la migración electroforética. Tomado de Snudtad, 1997.

buffer III (ver Apéndice B) para hacer un volumen total de 10 μ l de cada muestra y se hace pasar una corriente eléctrica de 90 V con una fuente de poder (Gibco BRL Life Technologies, modelo 250) durante 1 hora

(β -globina y Gp) o 40 minutos (My, LCR y E2). Después se verifica la presencia del segmento amplificado en un transiluminador tipo Visionary (Fotodyne modelo 220) (Figura 17).

H. Captura de híbridos.

Para esta prueba se utiliza un Kit Digene HPV Test Hybrid Capture[®], que detecta 18 tipos de DNA de VPH: 5 de bajo riesgo (6, 11, 42, 43 y 44) y 13 de alto riesgo de malignización (16, 28, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68). Esta prueba se basa en la detección de una señal luminosa emitida por la hibridación de sondas de RNA de VPH con DNA de VPH proveniente de muestras de tejido cervical mediante quimioluminiscencia cualitativa (Figura 18). La prueba consta de varias etapas, que se resumen a continuación:

Desnaturalización de las muestras. En primer lugar, se prepara el reactivo desnaturalizante y se agrega un volumen equivalente a la mitad del de las muestras en los tubos de las muestras y los calibradores; se agita vigorosamente con un vórtex a alta velocidad durante 5 segundos cada uno de los tubos por separado y se checa que todos presenten una coloración púrpura. Se incuba a $65 \pm 2^\circ \text{C}$ durante 45 ± 5 minutos y se prepara la mezcla para la prueba de VPH.

Cocktel para la prueba combinada. Se preparan los cockteles para las pruebas A y B; se agrega todo el contenido del cocktel de la prueba A diluida en el tubo que contiene el cocktel de la prueba B también diluido y se vortexea vigorosamente durante 10 segundos a máxima velocidad. Después, se adicionan $25 \mu\text{l}$ del cocktel de la prueba combinada en cada microtubo de hibridación, se mezclan bien las muestras desnaturalizadas y se le adicionan $75 \mu\text{l}$ a los tubos, se tapan y se adicionan a $1\ 100 \pm 100$ r.p.m. durante 3 minutos a $65 \pm 2^\circ \text{C}$, mientras se prepara la placa para la captura de híbridos.

Captura de híbridos. Se transfiere el contenido de cada microtubo de hibridación al pozo correspondiente en la placa de captura usando una pipeta multicanal (8 puntas), se tapa la placa y se agita a $1\ 100 \pm 100$ r.p.m. a $20\text{-}25^\circ \text{C}$ durante 60 ± 5 minutos, mientras se prepara el buffer de lavado. Después se decanta el sobrenadante de la placa y se elimina el exceso golpeando la placa contra una toalla de papel.

Conjugación de anticuerpos. Se adicionan $75 \mu\text{l}$ del reactivo de detección 1 en cada pozo de la placa y se cubre con parafilm. Se incuba durante 30 ± 3 minutos a $20 - 25^\circ \text{C}$ y después se decanta el sobrenadante y se

elimina el exceso golpeando la placa contra una toalla de papel. La placa se enjuaga 6 veces con el buffer de lavado, luego se drena sobre toallas de papel y se elimina el exceso golpeando la placa contra una toalla de papel.

Generación de la señal de hibridación. Se adicionan 75 μ l del reactivo de detección 2 en cada pozo y se incuba durante 15 minutos a 20 - 25° C. Esta señal de hibridación en la placa se lee en un luminómetro mediante pruebas de quimioluminiscencia cualitativa, que se valida e interpreta mediante programas computacionales específicos para obtener los resultados.

I. Seguimiento clínico de pacientes.

El seguimiento de las pacientes incluidas en el presente estudio, se realizó mediante la revisión de los expedientes de cada una de ellas en la Clínica de Displasias del Hospital General de México.

Dicha revisión, consistió en la recopilación de datos acerca del diagnóstico colposcópico e histopatológico, tratamiento al momento de su incorporación al estudio, seguimiento postratamiento (en meses) y los resultados de dicho seguimiento desde el momento del tratamiento hasta su alta del servicio.

1. Diagnóstico histopatológico.

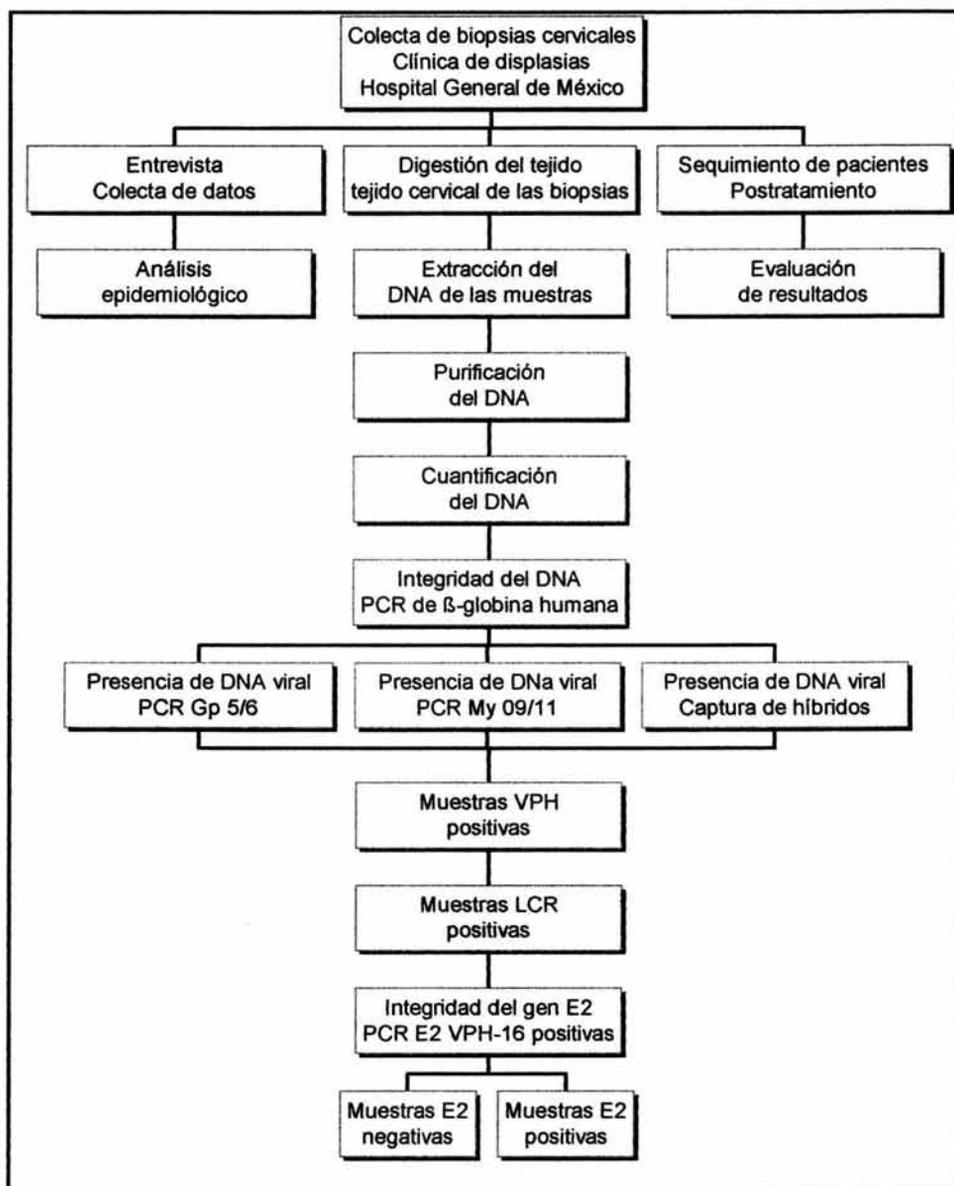
El diagnóstico histopatológico se obtiene también mediante la revisión de los expedientes de cada una de las pacientes estudiadas para establecer el grado de concordancia entre este diagnóstico y el proporcionado por el método colposcópico, debido a que sus resultados son considerados definitivos y muy precisos al interpretar mediante la observación con un microscopio de los cambios estructurales a nivel celular en las biopsias consideradas en el presente estudio.

2. Postratamiento.

El éxito del tratamiento de cada una de las pacientes se obtiene mediante la revisión de los expedientes de cada una de las pacientes estudiadas a lo largo de

un período comprendido entre 2 y 90 meses, con respecto al tratamiento recibido al momento de su incorporación al estudio, el cual puede ser LEEP (del inglés: *loop electrosurgical excision procedure*; procedimiento de extirpación con asa electroquirúrgica) o asa diatérmica; vaporización con láser (del inglés: *light amplification by stimulated emission of radiation*; amplificación de la luz por emisión de radiación estimulada); y, crioterapia mediante CO₂ líquido; así como la existencia de regresión de las lesiones cervicales halladas en cada una de ellas a lo largo del período de estudio.

J. Esquema de actividades.

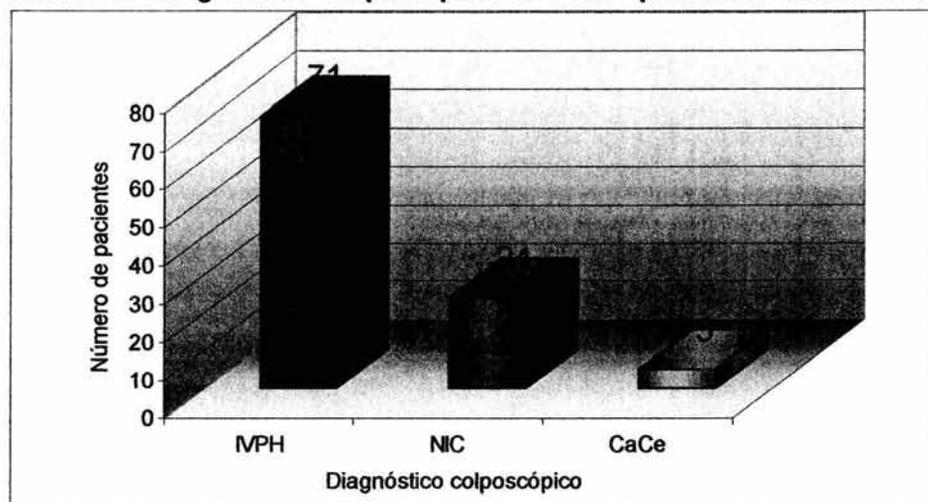


VII. Resultados

A. Diagnóstico clínico: Colposcopia.

Las biopsias cervicales dirigidas colposcópicamente obtenidas de pacientes que forman parte del presente estudio se diagnosticaron de la siguiente manera: 71 de ellas corresponden a infecciones por el virus del papiloma humano (IVPH), 24 coincidieron con características diagnósticas de neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC), mientras que las 5 biopsias restantes se clasificaron como carcinomas cervicales (CaCe), por un colposcopista experto del Centro Nacional de Clínicas de Displasias (CENACLID).

Gráfica 2. Diagnóstico colposcópico de las pacientes estudiadas.



IVPH: infección por virus del papiloma, NIC: neoplasia intraepitelial cervical y CaCe: cáncer cervical.

B. Epidemiología.

Paralelamente a la recolección de las biopsias se realizó a las pacientes un cuestionario enfocado a la búsqueda de factores de riesgo secundario asociados al desarrollo del CaCe con el que se analizaron variables como la edad de las

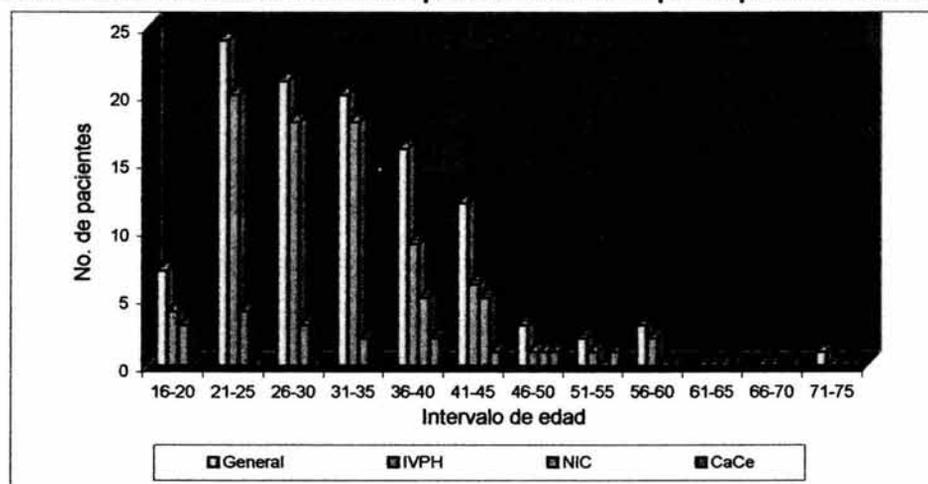
pacientes al momento del estudio, su edad al inicio de vida sexual activa (IVSA), número de hijos, uso de anticonceptivos orales y tabaquismo. Las Tablas 5 y 6 resumen los datos epidemiológicos encontrados en función del diagnóstico colposcópico.

Tabla 5. Factores de riesgo secundario de desarrollo de CaCe (epidemiología).

Tipo de lesión	Edad	IVSA	Hijos
IVPH	31.42 años	17.97 años	2.51 hijos
NIC	34.21 años	18.17 año	2.79 hijos
CaCe	43.80 años	18.40 años	6.80 hijos
Total	32.58 años	18.04 años	2.81 hijos

Los valores de las columnas de Edad, IVSA (inicio de vida sexual activa) e Hijos, representan sólo los promedios de cada factor en la población estudiada.

Gráfica 3. Distribución de edad de las pacientes reclutadas para el presente estudio.



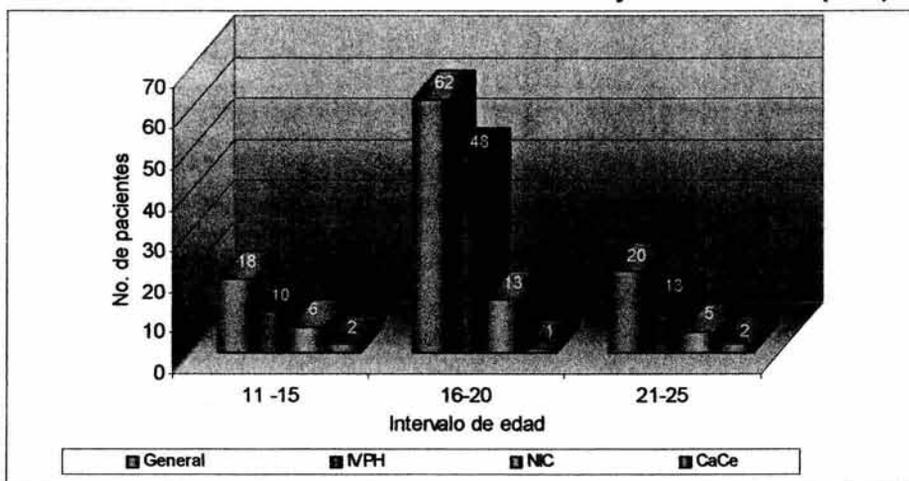
Los intervalos de edad se han dividido en décadas. Se puede observar que la mayor parte de las mujeres estudiadas presentan lesiones asociadas a la presencia del virus del papiloma humano en las primeras décadas de existencia.

De acuerdo con el diagnóstico colposcópico, en aquellas mujeres que en las que se presentan lesiones de tipo IVPH, la edad promedio es de 31.42 años (± 8.74). En el grupo de mujeres en las que se encontraron lesiones de tipo NIC, la edad promedio fue de 34.21 años (± 11.45). Por último, para el caso de las mujeres con diagnóstico colposcópico de CaCe, el promedio de edad se situó entre los 43.8 años (± 6.43). La edad promedio de las pacientes estudiadas fue de 32.58

años, lo que implica una disminución de aproximadamente 15 años con respecto a las investigaciones de von der Meden (1995) y Lazcano-Ponce (1995) que reportan promedios de edad de 47.5 años y 47.7 años respectivamente (Gráfica 3).

La edad al iniciar vida sexual activa (IVSA), en el caso de las pacientes con IVPH se situó en los 17.97 años (± 2.52). En el grupo de mujeres en las que se encontraron lesiones cervicales de tipo NIC, la mayoría inició su actividad sexual en promedio a los 18.7 años (± 3.46); mientras que el grupo con CaCe se inició a los 18.4 años (± 4.08). Estos datos concuerdan con los hallazgos de Lazcano-Ponce 18.15 años (1995) y von der Meden 45% ($n = 49$) (1995). Esto datos implican que las mujeres mexicanas inician su actividad sexual hacia el final de su segunda década de vida (Gráfica 4).

Gráfica 4. Edad al inicio vida sexual activa de las mujeres estudiadas (IVSA).

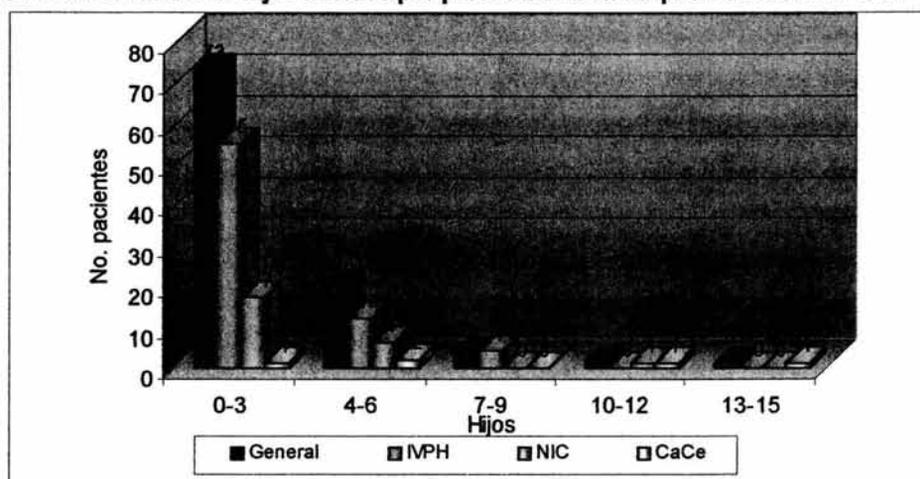


La gráfica nos muestra que el 79% de la población estudiada inició actividad sexual durante la segunda década de su vida.

La paridad también fue investigado en las mujeres del estudio, de ellas se supo que las mujeres con IVPH presentaron un promedio de 2.51 hijos/mujer (± 1.84); en las mujeres con NIC se encontró un promedio de 2.79 hijos/mujer

(± 2.45); mientras que en las mujeres que se encontró CaCe, el promedio de hijos por mujer de 6.80 (± 4.35). De forma general, las pacientes estudiadas presentaron un promedio de hijos de 2.81, número menor al encontrado por Lazcano-Ponce (1995) 5.23 y de von der Meden (1995) de 3 o más (Gráfica 5).

Gráfica 5. Número de hijos nacidos por parto natural en las pacientes estudiadas.



En esta gráfica puede observarse que la mayor parte del grupo de estudio (71%), sólo presentó de 0 a 3 gestaciones.

Tabla 6. Factores de riesgo secundario de desarrollo del CaCe (epidemiología).

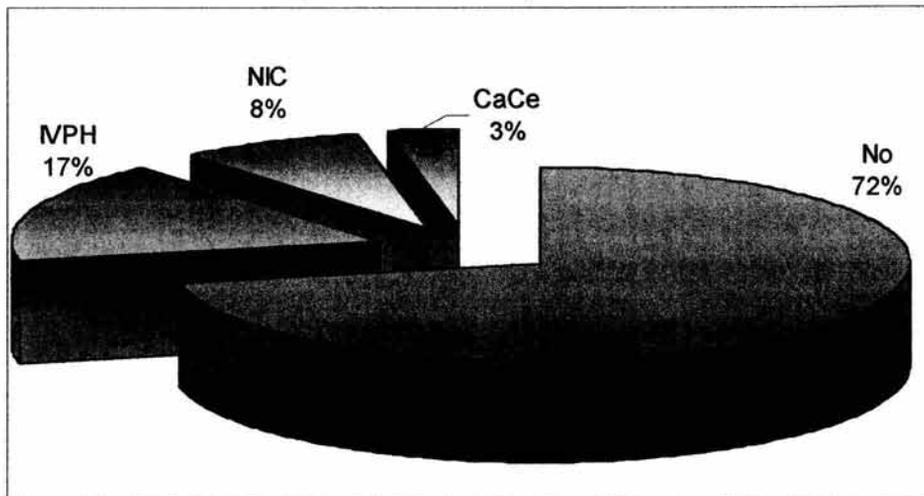
Tipo de lesión	Anticonceptivos orales	Hábito de Tabaquismo
IVPH	17 %	22 %
NIC	8 %	8 %
CaCe	3 %	3 %
Total	28 %	33 %

Los valores de las columnas de Anticonceptivos orales y Hábito de Tabaquismo, representan sólo los porcentajes usados en la población estudiada.

En cuanto a la población general, el 28% de ellas aceptaron haber utilizado anticonceptivos orales (Gráfica 6), divididas de la siguiente forma: en las mujeres pertenecientes al grupo clasificado como IVPH sólo el 23.94% (17) refirieron haber utilizado este tipo de método anticonceptivo, mientras que 33% de mujeres con NIC y, 60% (3) con CaCe los utilizaron (Gráfica 6). Estos datos concuerdan con los reportados en muchos trabajos en donde se evalúa el uso de

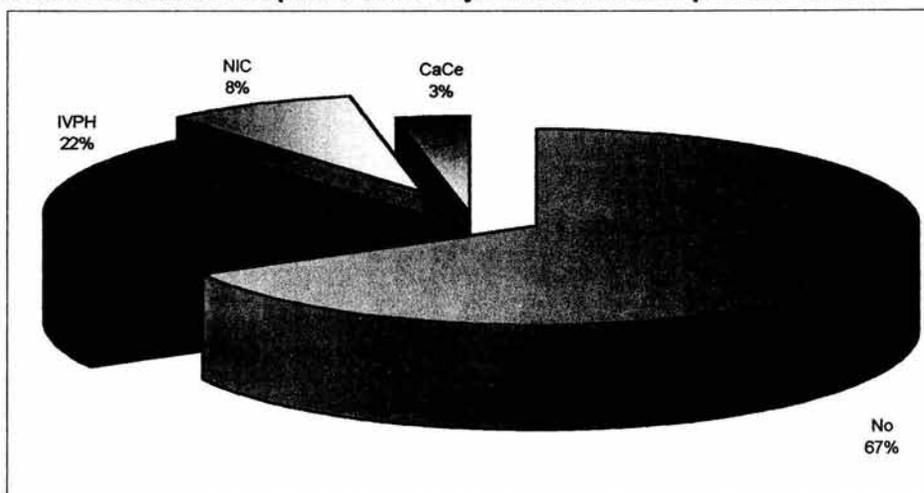
anticonceptivos orales y el riesgo de desarrollo de CaCe (Lazcano-Ponce, 1995, Castellsagué, 2003; de Villiers, 2003).

Gráfica 6. Uso de anticonceptivos orales en las pacientes estudiadas.



La mayor parte de la población estudiada refirió no ser fumadora.

Gráfica 7. Hábito de tabaquismo en las mujeres incluidas en el presente estudio.



El hábito del tabaquismo, casi resultó ser de igual proporción al de las mujeres que refirieron no fumar en la población de estudio.

En la población estudiada, 33% de las mujeres refirió ser fumadora habitual (Gráfica 7), hábito que se distribuye de la siguiente manera: 22% en el caso de IVPH; 8% para las mujeres con NIC y 3% en las mujeres con CaCe.

C. Diagnóstico molecular.

Para determinar la presencia del virus del papiloma humano en las biopsias cervicales dirigidas y diagnosticadas colposcópicamente, se realizaron dos métodos moleculares: la PCR y la Captura de Híbridos.

1. PCR general.

a. β -globina humana.

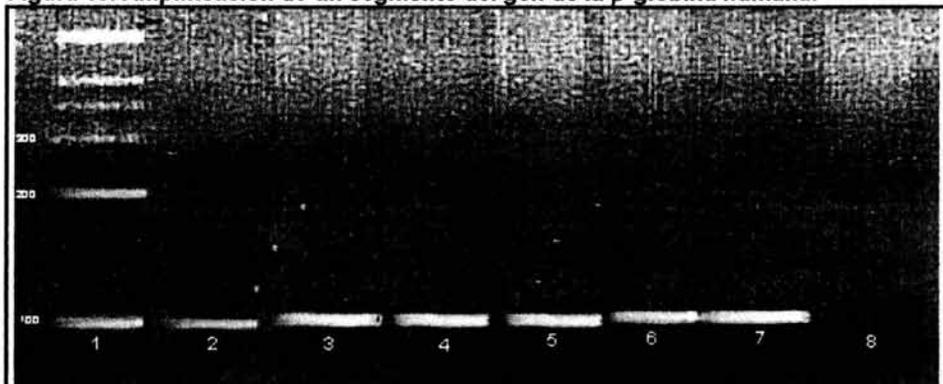
A todas las biopsias se les realizó una amplificación preliminar de un segmento del gen de la β -globina humana para determinar si el DNA obtenido es susceptible de ser amplificado por PCR. Mediante esta amplificación se obtuvo un segmento de aproximadamente 110 pb. En todos los casos, es decir, en las 71 biopsias diagnosticadas como IVPH; las 24 como NIC y las 5 como CaCe, fue posible amplificar este segmento. Los resultados de esta amplificación se resumen en la Tabla 7, que se presenta a continuación.

Tabla 7. Integridad del DNA obtenido de biopsias cervicales dirigidas colposcópicamente

Diagnóstico colposcópico	Número de pacientes	PCR β -globina
IVPH	71	71
NIC	24	24
CaCe	5	5
Total	100	100

Las abreviaciones IVPH, NIC y CaCe, significan: infección por virus del papiloma humano, neoplasia intraepitelial cervical y cáncer cervical, respectivamente.

Figura 18. Amplificación de un segmento del gen de la β -globina humana.



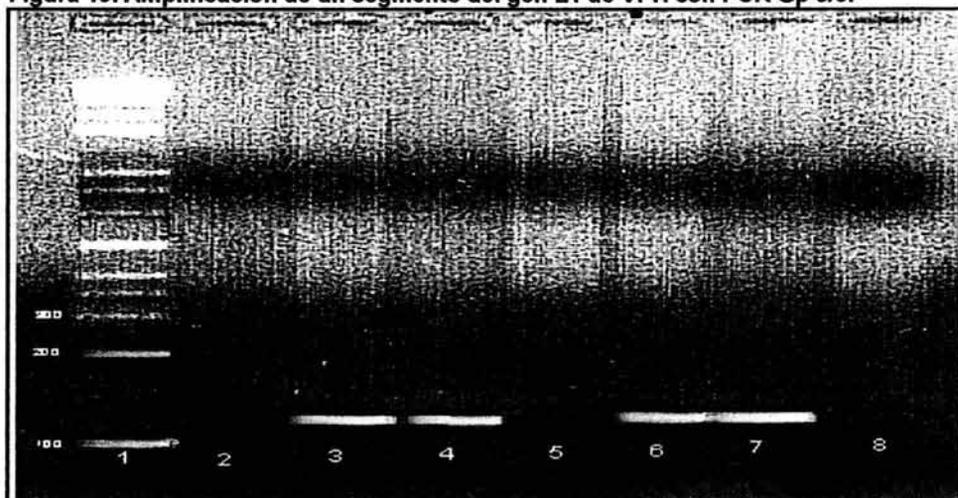
En la figura los carriles se distribuyen de la siguiente manera: 1, marcador de pesos moleculares (DNA ladder 100 bp); 2-6, contienen el amplificado de un segmento del gen de la β -globina humana contenido en el DNA de 5 biopsias cervicales humanas; 7, contiene el amplificado de la línea celular SiHa que actúa como control positivo y, el 8, contienen el control negativo que en este caso es H_2O .

Con esta PCR se comprueba la viabilidad del DNA extraído de las biopsias cervicales, pues en todas las biopsias pudo amplificarse este segmento. La Figura 18, muestra un gel representativo de este tipo de amplificación génica. En esta figura el primer carril corresponde al marcador de pesos moleculares de 100 pb (100 bp DNA ladder Gibco BRL), los siguientes 5 carriles corresponden a 5 muestras de DNA de las biopsias cervicales y los últimos dos corresponden a los controles de la reacción: el control positivo es DNA proveniente de una línea celular maligna (SiHa) y el control negativo que en este único procedimiento corresponde a H_2O .

b. PCR-Gp 5/6.

La presencia de DNA de VPH, se determinó en todas las biopsias cervicales dirigidas colposcópicamente mediante la amplificación de un segmento del gen L1 del genoma de los VPH's. Los oligonucleótidos Gp 5/6, están diseñados para amplificar un segmento de 150 pares de bases de aproximadamente 11 tipos virales tanto de alto como de bajo riesgo de malignización (Figura 19).

Figura 19. Amplificación de un segmento del gen L1 de VPH con PCR Gp 5/6.



En la figura los carriles se distribuyen de la siguiente manera: 1, marcador de pesos moleculares (DNA ladder 100 bp); 2-6, contienen el amplificado de un segmento del gen L1 de VPH contenido en el DNA de 5 biopsias cervicales humanas; 7, contiene el amplificado de la línea celular SiHa que actúa como control positivo y, el 8, contienen el DNA de melanoma murino como control negativo.

La Tabla 8, presenta los resultados de esta amplificación. De 71 biopsias tomadas a partir de lesiones diagnosticadas como IVPH, presentaron amplificado 47, resultando negativas (sin amplificado) 21 de ellas. Para las 24 biopsias diagnosticadas como NIC, se obtuvo amplificado en 17, resultando negativas 7 de ellas. Por último, se encontró amplificado en las 5 biopsias correspondientes a CaCe. Lo cual indica que en 69/100 biopsias tomadas de lesiones acetoblancas, estaba presente DNA de VPH.

Tabla 8. Detección del gen L1 de VPH mediante PCR Gp 5/6.

Tipo de lesión	PCR Gp 5/6 (+)	PCR Gp5/6 (-)	Muestras Analizadas
IVPH	49	22	71
NIC	17	7	24
CaCe	5	0	5
Total	71	29	100

IVPH, significa infección por virus del papiloma humano; NIC, neoplasia intraepitelial cervical y, CaCe, carcinoma cervical.

c. PCR-My 09/11.

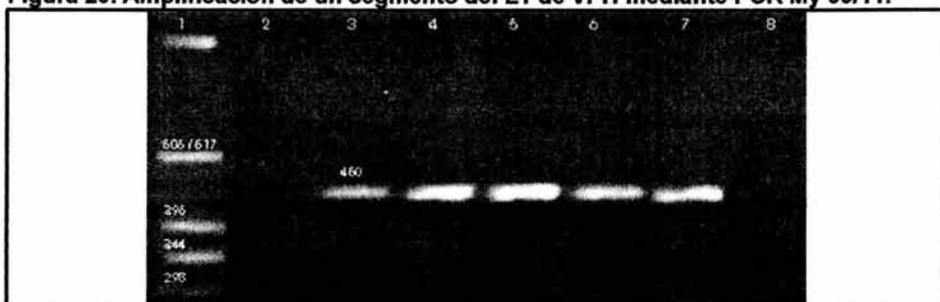
Los oligonucleótidos My 09/11 se utilizaron para amplificar un segmento de 450 pb del gen L1 del genoma VPH; con ellos, se confirmó la presencia de DNA viral en las biopsias cervicales.

Tabla 9. Detección de DNA de VPH mediante PCR My 09/11.

Tipo de lesión	PCR My09/11 (+)	PCR My09/11 (-)	Muestras Analizadas
IVPH	45	26	71
NIC	17	7	24
CaCe	5	0	5
Total	67	33	100

IVPH, significa infección por virus del papiloma humano; NIC, neoplasia intraepitelial cervical y CaCe, carcinoma cervical.

Figura 20. Amplificación de un segmento del L1 de VPH mediante PCR My 09/11.



En la figura los carriles se distribuyen de la siguiente manera: 1, marcador de pesos moleculares (DNA ladder 100 bp); 2-6, contienen el amplificado de un segmento del gen L1 de VPH contenido en el DNA de 5 biopsias cervicales humanas; 7, contiene el amplificado de la línea celular SiHa que actúa como control positivo y, el 8, contienen el control negativo que en este caso es H₂O.

De las 71 biopsias diagnosticadas como IVPH, se amplificó el segmento deseado en 45 de ellas, resultando negativas (es decir, sin amplificado) 26 de ellas. En las muestras de NIC, se determinó la presencia de DNA viral en 17 de ellas, siendo negativas 7; mientras que en las biopsias correspondientes a CaCe, se amplificó el segmento deseado en todas ellas. Estos resultados se resumen en la Tabla 9, que se presenta a continuación. Estos resultados demuestran una baja sensibilidad de estos oligonucleótidos con respecto a los Gp 5/6. En la fotografía presentada a continuación (Figura 20), se presentan algunos de los resultados de la amplificación mediante los oligonucleótidos My 09/11.

La determinación de la presencia de DNA viral en las muestras estudiadas mediante PCR en ambas pruebas comprobó su presencia en la mayoría de ellas. Lo que indica que las biopsias cervicales tienen un promedio de 69% congruencia entre ellas, estos resultados difieren del 100% esperado pero dichas diferencias no son estadísticamente significativas a una $p=0.005$. Es decir, que las lesiones acetoblancas sí corresponden a zonas de infección por VPH. Aunque las diferencias en detección son mínimas, esto puede deberse en parte, al tamaño del fragmento amplificado, pues para Gp5/6 es de 150pb mientras que par My09/11 es de 450 pb.

Tabla 10. Detección de DNA de VPH PCR Gp versus PCR My .

Tipo de lesión	PCR Gp5/6 (+)	PCR My09/11 (+)
IVPH	49	45
NIC	17	17
CaCe	5	5
Total	71	67

IVPH, significa infección por virus del papiloma humano; NIC, neoplasia intraepitelial cervical y CaCe, carcinoma cervical.

2. Captura de híbridos.

Paralelamente a la determinación por PCR del DNA de VPH en las biopsias cervicales, se realizó una prueba de captura de híbridos, la cual es capaz de detectar hasta 18 tipos virales de VPH del tracto genital: 5 de bajo riesgo y 13 de alto riesgo. Con ella, se pudo determinar la presencia de DNA de VPH en 96 biopsias cervicales, 3 resultaron ser negativas a este ensayo y 1 no se determinó (Tabla 11). Este tipo de prueba resulta ser mucho más sensible que la PCR, esto suele deberse a la capacidad de la prueba para generar una señal que amplifica la detección de DNA viral. Los datos obtenidos revelan que la detección por captura de híbridos de VPH es mucho más congruente con el diagnóstico colposcópico, para lo que podemos decir que las lesiones acetoblancas, corresponden a zonas de tejido infectadas con VPH.

Tabla 11. Detección molecular de DNA de VPH mediante Captura de Híbridos

Tipo de lesión	Captura de Híbridos (+)	Captura de Híbridos (-)	Muestras Analizadas
IVPH	70	1	71
NIC	22	2	24
CaCe	5	0	5
Total	97	3	100

IVPH, significa infección por virus del papiloma humano; NIC, neoplasia intraepitelial cervical; CaCe, cáncer cervical. El rendimiento de esta prueba es del 96.97 %.

La comparación de los resultados de las pruebas moleculares en función del diagnóstico colposcópico se presentan en la Tabla 12. La superioridad de la prueba de captura de híbridos es evidente pues se correlaciona con el diagnóstico colposcópico en 97% de los casos estudiados. El 71% obtenido de las pruebas de PCR indican de todas formas una alta probabilidad de encontrar DNA viral en lesiones acetoblancas de tejido cervical diagnosticado colposcópicamente.

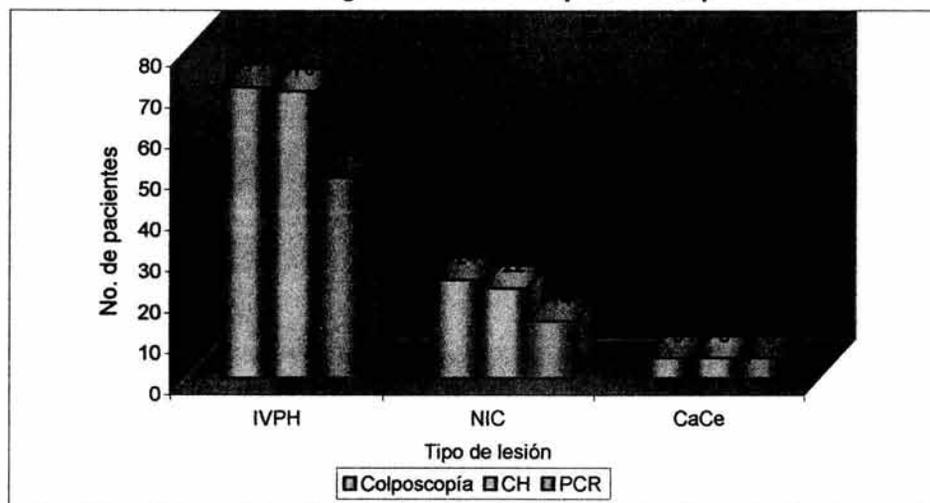
Tabla 12. Determinación de la presencia de DNA de VPH en la población de estudio.

Tipo de lesión	Captura de híbridos		PCR Gp 5/6	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
IVPH	70	1	49	22
NIC	22	2	17	7
CaCe	5	0	5	0
Total	97	3	71	29

La PCR Gp 5/6, se usa como dato comparativo al presentar el mayor número de detecciones positivas para la determinación general de la presencia de DNA viral.

En función del diagnóstico colposcópico, la mayor correlación se encuentra en las lesiones clasificadas como CaCe, pues los tres diagnósticos revelan la presencia de VPH. La PCR se vuelve más precisa en su diagnóstico de la presencia de DNA viral de VPH en cuanto avanza el estado de la lesión, es decir, que cuando la lesión presenta una historia natural reciente, como lo sería la VIP, su capacidad de detección es más baja, esto puede ser resultado de la variación en los tipos virales que pueden provocar una reacción positiva al ácido acético, no descartando que haya VPH sino al tipo viral que la provoque.

Gráfica 8. Resultado de los diagnósticos en las biopsias de las población estudiada.



Hay que recordar que tanto el diagnóstico colposcópico como el diagnóstico molecular toman en cuenta la presencia de VPH, mientras que el diagnóstico histopatológico y el diagnóstico colposcópico tienen en común que toman en cuenta los cambios estructurales provocados por este virus.

3. PCR tipospecífica.

a. Amplificación tipo específica mediante la LCR de VPH-16.

En las 100 biopsias se determinó la presencia del virus del papiloma humano tipo 16, debido a que es el tipo viral más frecuentemente asociado al cáncer cervical.

Las biopsias sometidas a esta reacción de amplificación, arrojaron los siguientes resultados: en 49 de las biopsias diagnosticadas como IVPH, se amplificó el segmento deseado dejando como negativas, por no encontrarse dicho amplificado a 22 de ellas. Para las biopsias consideradas como NIC, se encontró amplificado en 16 dejando como negativas a 8 de ellas; mientras que todas las biopsias consideradas como CaCe, presentaron amplificado. Los anteriores resultados se resumen en la Tabla 13. Esta observación es muy importante ya que demuestra que en la población estudiada el VPH-16 es el más frecuente en las lesiones acetoblancas detectadas por Colposcopia. La Figura 21, muestra una

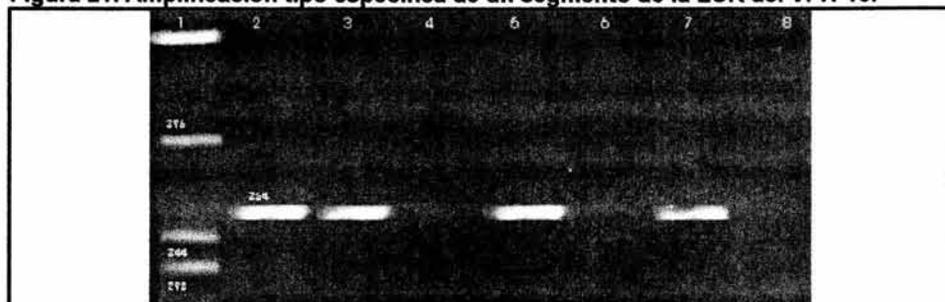
fotografía tomada de un gel representativo de la amplificación de un segmento de la LCR de VPH-16.

Tabla 13. Detección por PCR de un segmento de la LCR de VPH-16.

Tipo de lesión	PCR LCR VPH-16 (+)	PCR LCR VPH-16 (-)	Muestras Analizadas
IVPH	49	22	71
NIC	16	8	24
CaCe	5	0	5
Total	70	30	100

IVPH, significa infección por virus del papiloma humano; NIC, neoplasia intraepitelial cervical y CaCe, carcinoma cervical.

Figura 21. Amplificación tipo específica de un segmento de la LCR del VPH-16.



En la figura los carriles se distribuyen de la siguiente manera: 1, marcador de pesos moleculares (DNA ladder 100 bp); 2-6, contienen el amplificado de un segmento de la LCR de VPH-16 contenido en el DNA de 5 biopsias cervicales humanas; 7, contiene el amplificado de la línea celular SiHa que actúa como control positivo y, el 8, contienen el control negativo que en este caso es H₂O.

e. PCR-E2 de VPH-16.

Las biopsias se sometieron a esta reacción de amplificación con la finalidad de determinar la presencia del gen E2 completo de VPH-16. Los oligonucleótidos tipo específicos E2 forward y E2 reverse, y, en este caso, revelan la integridad del gen que codifica para la proteína reguladora de la transcripción viral. Mucho se ha especulado acerca de que la disrupción de este gen es el responsable de la progresión de la malignización celular del epitelio cervical, si esto es cierto, las lesiones cervicales clasificadas colposcópicamente como IPVH, deberían presentar un amplificado de este gen.

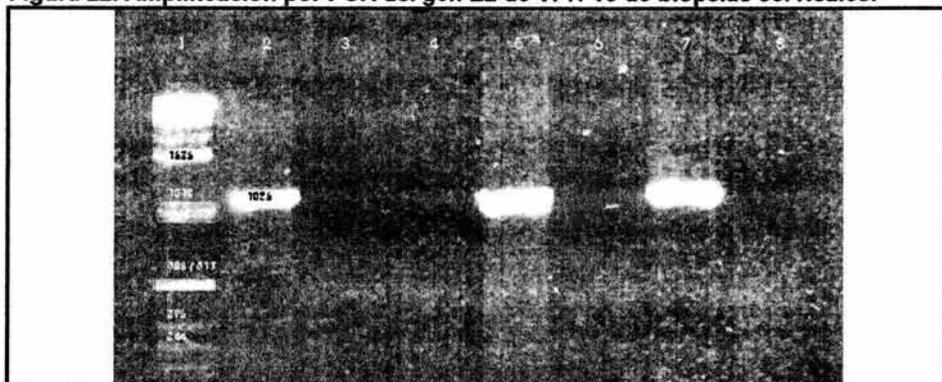
La Tabla 14, resume los hallazgos de esta amplificación tipo específica. Para el caso de las biopsias de IVPH, se encontró que 24 de ellas presentaron un amplificado. En el caso de las biopsias de NIC, tan sólo 6 mostraron amplificado. Por último, las biopsias de CaCe, tuvieron 2 amplificados. Estos resultados demuestran que la ruptura del gen E2, sucede aún en etapas tempranas de la historia de desarrollo del cáncer cervical como lo es la IVPH. La Figura 22, corresponde a la fotografía de un gel representativo de esta amplificación.

Tabla 14. Detección por PCR específica del gen E2 de VPH-16.

Tipo de lesión	PCR-E2 VPH-16 (+)	PCR-E2 VPH-16 (-)	Muestras Analizadas
IVPH	24	47	71
NIC	6	18	24
CaCe	2	3	5
Total	32	68	100

En esta amplificación, el número de muestras detectadas también corresponde al porcentaje de detección del ensayo.

Figura 22. Amplificación por PCR del gen E2 de VPH-16 de biopsias cervicales.



En la figura los carriles se distribuyen de la siguiente manera: 1, marcador de pesos moleculares (DNA ladder 1 kb); 2-6, contienen el amplificado el gen E2 de VPH-16 contenido en el DNA de 5 biopsias cervicales humanas; 7, contiene el amplificado de la línea celular SiHa que actúa como control positivo y, el 8, contienen el control negativo que en este caso es H₂O.

D. Diagnóstico histopatológico.

El resultado del estudio patológico se considera como el diagnóstico definitivo de una biopsia. El tejido cervical de cada una de las pacientes incluidas

en el presente estudio, confirmó el diagnóstico colposcópico en un 64% de los casos (Tabla 15). De acuerdo de la diagnóstico colposcópico, los resultados se describen en los siguientes párrafos.

Tabla 15. Diagnóstico histopatológico de las biopsias cervicales dirigidas por Colposcopia.

Tipo de lesión	Dx. Colposcopia	Dx. Histopatología
IVPH	71	58
NIC	24	5
CaCe	5	1
Total	100	64

Dx. Diagnóstico

De la 71 biopsias cervicales tomadas de las lesiones cervicales diagnosticadas como IVPH, se confirmó por medio de estudio histopatológico sólo en 58 de los casos (81.69%). Aunque el diagnóstico histopatológico menciona como alteraciones inflamatorias a 7 biopsias, éstas mismas resultaron ser positivas a la presencia de VPH en el diagnóstico molecular (PCR y Captura de Híbridos).

Los casos de las biopsias determinadas como NIC y clamidiasis, también fueron positivos al diagnóstico molecular. A pesar de que la biopsia reportada como otro tipo de cambios morfológicos, no fue positiva al diagnóstico por PCR, la Captura de Híbridos la reporta como positiva. Una de las biopsias corroboradas como IVPH por la histopatología, resultó ser negativa a ambos métodos moleculares.

Para las biopsias cervicales diagnosticadas colposcópicamente como NIC, histopatología reportó que sólo 5 casos (20.83%) correspondían a este tipo de lesión, 15 casos más se reportaron como IVPH, 2 como alteraciones inflamatorias y 2 más como cáncer cervical invasor (Tabla 13).

Las lesiones reportadas como alteraciones inflamatorias fueron positivas para ambos métodos moleculares. Es interesante hacer notar que 2 de las

biopsias diagnosticadas como NIC resultaron ser negativas por los dos diagnósticos moleculares.

En cuanto a las pacientes que presentaron lesiones diagnosticadas como CaCe, sólo 1 (20%) de ellas presentó alteraciones morfológicas y estructurales relacionadas a cáncer cervical, 3 de las pacientes se reportaron como NIC y 1 más como IVPH. Por otro lado, el diagnóstico molecular para todas las pacientes fue positivo, tanto por PCR como por Captura de Híbridos. La gráfica 9, resume los resultados del diagnóstico histopatológico de estas pacientes.

E. Seguimiento clínico

De las 100 pacientes incluidas en el presente estudio, 73 pudieron ser monitoreadas a lo largo de un periodo comprendido ente 2 y 90 meses (con un promedio de monitoreo de 18.20 meses de seguimiento). 61 pacientes fueron tratadas mediante LEEP (del inglés, *loop electrosurgical excision procedure*, procedimiento de excisión con asa electroquirúrgica); 4 pacientes más fueron tratadas con vaporización láser (del inglés, *light amplification by stimulated emission of radiation*; amplificación de la luz por emisión de radiación estimulada) y, mediante crioterapia con CO₂ líquido, se trató a 10 pacientes.

41 pacientes quedaron libres de lesión al primer tratamiento, 17 presentaron 1 regresión y 17 pacientes tuvieron 2 o más regresiones. Estos resultados se encuentran resumidos en la Tabla 16.

Tabla 16. Seguimiento clínico del tratamiento colposcópico de las pacientes.

Dx colp	Pacientes seguidas	Meses x	LEEP	Láser	Crioterp	R 0	R 1	R 2 o n
IVPH	53	17.45	43	2	8	28	15	10
NIC	19	17.37	17	1	1	12	2	5
CaCe	3	36.67	1	1	1	1	0	2
Total	75	18.20	61	4	10	41	17	17

Dx colp, significa diagnóstico colposcópico; x, promedio; LEEP, procedimiento de electroexcisión; Crioterp, crioterapia; R0, cero regresiones; R1, una regresión y R2 o n, dos o más regresiones.

VIII. DISCUSIÓN

A pesar de que el diagnóstico del cáncer cervical (CaCe), se ha hecho de manera casi exclusiva mediante la citología exfoliativa cervical o prueba de Papanicolaou y de sus innegables resultados en cuanto a la disminución de la incidencia de este tipo de cáncer en los países desarrollados; el fracaso de la prueba en los países en vías de desarrollo y el consecuente incremento del CaCe en ellos, requiere de un replanteamiento de los programas de salud pública (Lazcano-Ponce, 1996a; Lazcano-Ponce, 1996b; Lazcano-Ponce, 1999) y, por lo tanto, de la búsqueda de nuevos métodos capaces de detectar lesiones tempranas que puedan convertirse en cáncer con el paso del tiempo.

Sabemos que en la historia natural del cáncer cervical la infección por virus del papiloma humano (IVPH), precede a la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) y ésta a su vez, al CaCe (Schneider, 1988). El reconocimiento del origen viral del CaCe, así como el hecho de que esta enfermedad atraviese por un proceso que abarca varios años de desarrollo (Broker y Botcham, 1986; Fields, 1996; Park, 1995); abre la posibilidad de prevenir con mayor eficacia este padecimiento al reconocer y tratar oportunamente lesiones tempranas de este tipo de cáncer (Reid, 1984; Jones, 1990; zur Hausen 1970; Vasconcelos, 1992; Broker y Botcham, 1986; Fields, 1996; CancerNet, 2000).

La Colposcopia ha venido a constituirse como un método innovador que actualmente forma parte integral de los programas de detección y diagnóstico del CaCe, no sólo para la detección del mismo, sino también de sus lesiones precursoras. (CPCWeb, 2000; van Le, 1993; Ruíz, 1985; McCord, 1991; Spitzer, 1987; Bamford, 1983; Tovell, 1976; Edibiri, 1990; von der Meden, 1995; Schneider, 1988, Vasconcelos, 1992; Gon zález-Sánchez, 1998). Las diferencias entre los distintos tipos de lesiones pueden determinarse colposcópicamente a través de la presencia de epitelio acetoblanco y la observación de características de valor diagnóstico como extensión de las lesiones, severidad del cambio premaligno y

existencia de superficies con capilares aberrantes asociadas a la presencia de VPH tras la aplicación de ácido acético (Reid, 1984).

Las lesiones tempranas son las más frecuentemente detectadas con la Colposcopia, lo que hace factible su tratamiento oportuno y la consiguiente eliminación del VPH. La evaluación del diagnóstico colposcópico de la infección por VPH se analizó mediante métodos de detección molecular como PCR y Captura de Híbridos del DNA viral. Las biopsias dirigidas colposcópicamente, fueron tomadas del tejido cervical que presentó zonas acetoblacas las cuales son consideradas como sitios de IVPH, después de haber aplicado ácido acético al 15% (Cavaslu; 1996; Cruz-Talonia, 1985; Torres_Lobatón; 1988; Jonson, 1997; Reid, 1984; Reid, 1985; von der Meden, 1995; Moscicki, 1992; Schiffman, 1995; Brown, 1996).

Paralelamente al estudio de las biopsias de tejido cervical, se realizó un breve estudio epidemiológico para analizar los factores asociados al desarrollo del CaCe, como edad al momento de su incorporación al estudio, edad al inicio de vida sexual activa, número de hijos, uso de anticonceptivos orales y tabaquismo; mediante una breve entrevista a las pacientes.

En los datos obtenidos durante la entrevista de las pacientes estudiadas acerca de los factores que pueden influir en el desarrollo del cáncer cervical, encontramos que la edad promedio (32.8 años) de mujeres que presentaban lesiones asociadas a la presencia de VPH es menor al reportado por Lazcano-Ponce en 1995 de 47.7 años. Lo cual nos indica que las mujeres que se infectan con este virus son cada vez más jóvenes en los países en vías de desarrollo, trayendo como consecuencia una sobrecarga en los servicios de salud pública.

Otro factor que se ha asociado frecuentemente al desarrollo de este tipo de lesiones es el inicio de la vida sexual durante la adolescencia, pues los cambios hormonales típicos de esta etapa afectan directamente la ubicación de la zona de

transformación del epitelio cervical en las mujeres que es el sitio de infección del VPH (Miessels, 1977; Fassal, 1981; Clarke, 1985; Park, 1995; Kiviat, 1987). La edad promedio al inicio de la vida sexual de 18.04 años, es congruente con el 18.15 años de Lazcano-Ponce (1995); es decir, que la muchas mujeres mexicanas inician su vida sexual entre los 16 y los 20 años de edad como lo reportó en 1995 von der Meden en su estudio.

También se ha mencionado al número de hijos por mujer como un factor predisponente para el desarrollo del CaCe, en este rubro, la pacientes estudiadas presentaron un promedio de hijos de 2.81 por mujer; mientras que Lazcano-Ponce reportó en 1995 un promedio de 6.22 para su estudio, por otro lado, von der Meden (1995) reportó un promedio de 3 hijos por mujer; de manera que este factor no es estadísticamente significativo ($p=0.05$) como determinante del desarrollo de la enfermedad en las pacientes estudiadas.

El uso de anticonceptivos orales y el tabaquismo constituyen dos factores predisponentes que también pueden favorecer el desarrollo de CaCe. En 28% de las pacientes estudiadas refirieron el uso de anticonceptivos y el 33 % tener el hábito del tabaquismo, a lo que Lazcano-Ponce (1995) refiere en su trabajo haber encontrado un 33.7% y 27.2%. Lo anterior puede indicar que el uso de anticonceptivos orales y el tabaquismo no presentan niveles significativos en el desarrollo de lesiones precancerosas en las pacientes estudiadas.

Durante la década pasada, se realizó comúnmente la detección de DNA de VPH en muestras de tejido cervical mediante PCR (Das, 1992; Snijders, 1990; van den Brule; 1990; de Roda-Husman; 1995; Baay, 1996; Karlsern, 1996). En el presente estudio la presencia de DNA de VPH, se determinó mediante PCR Gp5/6 (van den Brule, 1990) en 69/100 de las muestras las cuales representan un porcentaje mayor al reportado anteriormente en la literatura pues los trabajos de van den Brule de 1990, reportan sólo un porcentaje de detección del 20% ($n = 459$), Snijders también del mismo año reportó el 21.53% ($n = 98$) en su trabajo,

mientras que de Roda-Husman en 1995 encontró sólo 38.84% (n = 102); mientras que otros reportaron el 57.40% (n = 93) (Baay, 1996) y 65% (n = 265) de Karlsen también de 1996, es decir, que en nuestro estudio el aumento en el porcentaje de detección del virus puede deberse al uso de muestras frescas, pues la mayoría de las determinaciones en la literatura se hace en muestras de archivo de lesiones de tipo NIC y CaCe.

Paralelamente, se llevó a cabo una segunda determinación de la presencia de DNA de VPH a manera de control, mediante PCR My 09/11, en la que encontramos que 72 muestras presentaron amplificado con este par de oligonucleótidos, mientras que Karlsen (1996) obtuvieron 91% (n = 141), Baay (1996) reportó haber encontrado sólo el 46.9% (n = 162). Esto significa que DNA del VPH encontrado en la mayoría de las muestras (72/100) en muestras concuerda con el diagnóstico colposcópico de presencia de infección viral.

Al sumar los promedios de cada una de las amplificaciones generales, obtenemos en promedio un porcentaje de detección del 70.5%. Esto indica que al menos 70 de los casos estudiados presentaron DNA de VPH detectable por medio de la amplificaciones generales de VPH (Gp 5/6 y My 09/11). Este porcentaje de detección no es estadísticamente significativo aún al compararlo con el 99.7% de detección de Walboomers (1999). Es más, de acuerdo con éste último, todos los casos de CaCe en el mundo se deben a la presencia de VPH, si comparamos los resultados de las biopsias de CaCe por Colposcopia, entonces veremos que las 5 muestras de tejido presentaron amplificado para ambos tipos de PCR, lo que confirma las conclusiones del autor y reafirma que el hallazgo colposcópico de CaCe está asociado con la presencia de DNA viral. Estos resultados (Gp 5/6 y My 09/11) nos indican que la Colposcopia es un buen método para detectar, de manera cualitativa, lesiones acetoblanas asociadas a la presencia de VPH.

La captura de híbridos se tomó como un control de las pruebas de PCR y también para determinar la presencia de DNA viral en las muestras cervicales.

96/99 de las muestras presentaron reacción positiva a la presencia de VPH. De esta forma, corroboramos que la Colposcopia tiene un alto valor diagnóstico en las lesiones tempranas y precursoras del cáncer cervical. Es de notarse que tres biopsias cervicales fueron totalmente negativas en el estudio, estos resultados concuerdan con los reportados por Cavaslu (1996), Shiffmann (1995) y Brown (1996).

Los tipos virales más comúnmente asociados al cáncer cervical a nivel mundial son el 16 y 18 (zur Hausen, 1991 a y b, Bosch,). Debido a ello, se realizó la determinación del VPH16 en las biopsias mediante la amplificación de un segmento de la LCR de VPH-16, la cual presentó resultados positivos en el 70% de los casos estudiados.

Para el presente estudio el 70% de las biopsias presentaron amplificados correspondientes al VPH-16, el cual es considerado como el más frecuente en la población mexicana (Hernández-Ávila, 1997; González-Garay, 1992).

Una segunda amplificación tipo específica se realizó con los oligonucleótidos E2 de Rocha-Zavaleta (1997). Estos oligonucleótidos son capaces de detectar el gen E2 completo del VPH-16; en las muestras de tejido cervical estudiadas sólo el 32% de las muestras presentaron amplificado correspondiente a este gen. Mucho se ha especulado acerca de que la interrupción de este gen promueve el desarrollo del cáncer cervical (Jeon, 1995; Chen, 1994; Daniel, 1995; Veress, 1999; Vernon, 1997; Dowhanick, 1995; Bauer-Hoffan, 1996; Sanders, 1995). El gen E2 es un factor que actúa como represor de la transcripción viral en la LCR viral, por lo que su interrupción conduciría a la inmortalización y malignización celular (McBride, 1991; Romanczuk, 1992; Vernon, 1997; Daniel; 1997). Al analizar el estado físico del DNA viral Di Luca (1986) y Lehn (1988), reportaron la presencia de escaso número de genomas integrados en lesiones de tipo NIC.

Los tumores desarrollados a partir de lesiones tempranas conocidas como displasias o neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC's), pueden revertirse o persistir (Howley, 1991). En la mayoría de los tumores cervicales, se encuentra integrado al DNA celular el DNA viral, por el contrario las lesiones de tipo NIC presentan el DNA viral en forma episomal (Dürst, 1985; Cullen, 1991; zur Hausen, 1991; Kajinovic, 1993; Das, 1992). De acuerdo con Howley (1991), en el estado de NIC cuando las infecciones por VPH pueden persistir o revertir, ya que es en ellas en donde el DNA viral se integra al DNA celular; dicha reversión puede tener relación con el tiempo de integración del DNA viral (Awady, 1987; Daniel, 1997; Daniel, 1995; Das, 1982; Cullen, 1991; Di Luca, 1986; Dürst, 1985; Howley, 1991; Lehn, 1988; McBride, 1991; Krajinovic, 1993; Sánchez-Pérez, 1997; Romanczuk, 1992; Bollen, 1997). Los resultados obtenidos en el presente estudio acerca de la amplificación del gen E2 del VPH-16, indican que la disrupción de este gen ocurre en etapas muy tempranas en las células infectadas del epitelio cervical.

Las pruebas moleculares arrojaron un 97% de compatibilidad con el diagnóstico colposcópico. De esta manera podemos asegurar que las biopsias tomadas del tejido cervical que presentó regiones acetoblancas si son indicativas de la presencia de la infección por virus del papiloma humano (Jonson, 1997; Octaviano, 1982; van Le, 1993). Además, el hecho de que en la mayoría de las biopsias cervicales tratadas y erradicadas por Colposcopia, se detectara DNA de VPH-16 previene la progresión de estas lesiones hacia CaCe.

El seguimiento clínico de las pacientes incluyó los resultados del diagnóstico histopatológico y las regresiones de las infecciones por virus del papiloma humano al momento del reclutamiento. En cuanto al diagnóstico histopatológico se corroboró el diagnóstico colposcópico en el 64% de los casos. La mayor concordancia entre estos dos diagnósticos se encontró en las lesiones subclínicas de infección por virus del papiloma humano con 81.69%, lo que significa que estas lesiones son más factibles de determinarse correctamente mediante Colposcopia.

El tratamiento dirigido por Colposcopia: vaporización láser o crioterapia, demostró su efectividad al estudiar el número de regresiones que presentaban cada uno de ellos. Solo se monitorearon 75 de las 100 pacientes reclutadas en un principio. Poco más de la mitad 57.33% no presentaron ninguna regresión, las cuales fueron atendidas por medio de vaporización láser, mientras que todas las pacientes tratadas mediante crioterapia presentaron una o más regresiones.

IX. CONCLUSIONES

- La Colposcopia es una técnica de diagnóstico útil en la detección de lesiones precursoras de CaCe.
- La detección de Virus de Papiloma Humano (VPH), mediante técnicas moleculares, como PCR y Captura de Híbridos, corrobora la presencia del virus en lesiones acetoblancas visualizadas mediante Colposcopia.
- Los estudios moleculares demuestran una confiabilidad de hasta el 60% en la detección de la presencia del virus del papiloma humano en lesiones cervicales diagnosticadas por Colposcopia.
- El tipo viral más común encontrado en las biopsias cervicales estudiadas es el VPH-16.
- La disrupción del gen E2, responsable de la regulación de los genes virales de VPH, puede darse aún en etapas tempranas del desarrollo de lesiones precursoras de CaCe.
- El seguimiento postratamiento de las pacientes tratadas mediante técnicas colposcópicas asegura que al menos en el 54.67% de los casos estudiados las pacientes quedan libres de lesiones al primer tratamiento.
- Las técnicas colposcópicas utilizadas para retirar lesiones tienen distintos porcentajes de efectividad, siendo la de mejores resultados el asa diatérmica en comparación con la Crioterapia o la vaporización láser.

X. BIBLIOGRAFÍA

All the Virology on the WWW. 15/01/2003. [on line]. <http://www.tulane.edu>.© 2003.

Alonso de Ruíz P, Lazcano-Ponce EC, Duarte-Torres R, Ruíz-Juárez L, Martínez-Cortéz L. 1996. Reproducibilidad diagnóstica del Papanicolaou en dos zonas de México: Necesidad de mecanismos de control de calidad. *Boletín de la Oficina Sanitaria de Panamá.* **126:** 518-527.

Androphy EJ, Lowy DR, Shiller JT. 1987. Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature.* **325:** 70-73.

ATCC. 4/01/80. [on line]. <http://WWW.phage.atcc.org>.© 2000.

Aurelian L. 1983. Evidence of a viral etiology of squamous cell carcinoma of the cervix. *En: Griffiths CT, Fuller AF (Eds.). Gynecologic Oncology.* Martinus Nijhoff Publishers. Boston, U.S.A.

Ausebel FM. et al. (Eds.). 1989. The polymerase chain reaction: *in vitro* enzymatic amplification of DNA. *En: Short protocols in molecular biology. Section V.* Harvard Medical School. Green Publishing Associates and Willey-Interscience. U.S.A. 136-137.

Awady M, KaplanJ, O'Brien R, Burks S. 1987. Molecular analysis of integrated papillomavirus 16 sequence in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology.* **159:** 389-398.

Bamford Ph, et al. 1983. The natural history of cervical intraepithelial neoplasias

- as determined by cytology and colposcopic biopsy. *Acta Cytologica*. **27**:482.
- Banerjee SK, Makdisi WF, Weston AP, Mitchell SM, Campbell DR.** 1995. Microwave-based DNA extraction from paraffin embedded tissue for PCR amplification. *Biotechniques*. **18**: 768-773.
- Barbosa MS, Schlegel R.** 1989. The E6 and E7 genes of HPV-18 are sufficient for inducing two stage in vitro transforming of human keratinocytes. *Oncogene*. **4**: 1529-1532.
- Bauer-Hoffman R, Borghouts C, Auvinen E, Bourda E, Röst F, Alonso A.** 1996. Genomic cloning and characterization of the nonoccupied allele corresponding to the integration site of human papillomavirus type 16 DNA in the cervical cancer cell line SiHa. *Virology*. **217**: 33-41.
- Bauknecht T, Jundt F, Herr I, Oehler T, Delius H, Shi Y, Angel P, zur Hausen H.** 1995. A switch region determines the cell type-specific positive or negative action of YY1 on the activity of the human papillomavirus type 18 promotor. *Journal of Virology*. **69**: 1-12.
- Berstein A, Harris B.** 1984. The relationship of dietary and serum vitamin A to the occurrence of cervical intraepithelial neoplasia in sexually active women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **148**: 309-312.
- Benson JD, Howell PM.** 1995. Amino-terminal domains of the bovine papillomavirus type 1 E1 and E2 proteins participate in complex formation. *Journal of Virology*. **69**: 4364-4372.
- Bertini-Oliveira A.** 1983. Comparative evaluation of abnormal cytology, colposcopy and histopathology in preclinical cervical malignancy during pregnancy. *Obstetrics and Gynecology Surveys*. **38**: 118-122.

- Bollen LJM, Tjong-A-Hung SP, van der Velden J, Brouwer K, Mol BW, ten Kate FJW, ter Schegget J.** 1997. Human papillomavirus deoxyribonucleic acid detection in mildly or moderately dysplastic smears: A possible method for selecting patients for colposcopy. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **177**: 548-553.
- Bonne-André C, Santucci S, Clertant P.** 1995(a). Bovine papillomavirus E1 protein can, by itself, efficiently drive multiple rounds of DNA synthesis *in vitro*. *Journal of Virology*. **69**: 3201-3205.
- Bonne-André C, Santucci S, Clertant P, Tillier F.** 1995(b). Bovine papillomavirus E1 protein binds specifically DNA polymerase α but not replication protein A. *Journal of Virology*. **69**: 2341-2350.
- Borysenko M, Borysenko J, Beringer T, Gustavson A.** 1985. *Histología Funcional*. Limusa. México, D.,F.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV.** 1995. Prevalence of human papillomavirus in cancer cervical: a worldwide perspective. *Journal of the National Cancer Institute*. **87**: 796-802.
- Boyce JG, Lu T, Nelson JH Jr, Fruchter RG.** 1997. Oral contraceptives and cervical carcinoma. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **128**: 761-766.
- Boydland L, Stein ZA.** 1991. The epidemiology of HPV infectious in children and their mother-vertical transmission. *Epidemiology Reviews*. **13**: 143-177.
- Bream GL, Ohmstede CA, Phelps WC.** 1993. Characterization of human papillomavirus type 11 E1 and E2 proteins expressed in insect cells. *Journal*

of Virology. **67**: 2655-2663.

Breitbart F, Croissant O, Orth G. 1987. Expression of human papillomavirus type 1 E4 gene products in warts. *Cancer Cells*. **5**: 115-122.

Broker TR, Botchan M. 1986. Papillomaviruses: Retrospectives and prospectives. *Cancer cell*. **4**: 17-36.

Buckley JD, Harris RWC, Doll R, Vessey MP, Williams PT. 1981. Case-control study of the husbands of woman with dysplasia of carcinoma of the cervix uteri. *American Journal of Clinical Nutrition*. **2**: 1010-1015.

Burkhardt A, DiMaio D, Schlegel R. 1987. Genetic and biochemical definition of the bovine papillomavirus E5 transforming protein. *European Molecular Biology Organization Journal*. **6**: 2381-2385.

Burkhardt A, Willingham M, Gay C, Jeang KT, Schlegel R. 1989. The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology*. **170**: 334-339.

Butterworth CE Jr, Hatch KD, Gore H, Mueller D, Krumdieck CL. 1982. Improvement in cervical dysplasia associated with folic acid therapy in user of oral contraceptives. *American Journal of Clinical Nutrition*. **35**: 73-82.

Burnett S, Jareborg N, DiMaio D. 1992. Localization of bovine papillomavirus type 1 E5 protein to transformed basal keratinocytes and permissive differentiated cells in fibropapilloma tissue. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **89**: 5655-5659.

CancerNet. 8/05/00.[on line]. <http://www.Cancernet.nci.nih.gov>.

- Cason J, Kaye JN, Jewers RJ, Kambo PK, Bible JM, Kell B, Shegill B, Pakarian F, Raju KS, Best JM, 1995.** Perinatal infection and persistence human papillomavirus type 16 and 18 infants. *Journal of Medical Virology*. **47** : 209-218.
- Cartier R.** 1984. Practical Colposcopy. 2th. Edition. Laboratoire Cartier. Paris.
- Cavaslu S, Mant C, Starkey WG, Bible JM, Biswas C, Kell B, Rice P, Best M, Cason J.** 1996. Analytic sensitivities of hybrid-capture consensus and type-specific polymerase chain reaction for the detection of human papillomavirus type 16 DNA. *Journal of Medical Virology*. **49**: 319-3324.
- Clarke EA, Hatcher J, McKeon-Eyssen GE, Lickrish GM.** 1985. Cervical dysplasia association with sexual behaviour, smoking and oral contraceptive use? *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **151**: 612-616.
- Clerfant P, Seif I.** 1984. A common functions for polyoma virus large-T and papillomavirus E1 proteins? *Nature*. **311**: 276-279.
- Chen CM, Shyu MP, Au LC, Chu HW, Cheng WTK, Choo KB.** 1994. Analysis of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: A rapid multiplex polymerase chain reaction approach. *Journal of Medical Virology*. **44**: 205-211.
- Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT.** 1992. Viral E1 and E2 proteins support the replication of homologous and heterologous papillomavirus origins. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **89**: 5799-5803.
- Cobrinik D, Dowdy SE, Hinds PW, Mittnacht S, Weinberf RA.** 1992. The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *Trends in*

Biochemical Science. **17**: 276-279.

Coppleson M, Pixley E, Reid B. 1978. Colposcopy. Second edition. Charles C. Thomas. Springfield, IL. U.S.A.

CPCWeb. 21/11/00.<http://WWW.cpcweb.com.ar>

Cross HE, Kennel EE, Lilienfeld AM. 1968. Cancer of the cervix in an Amish population. *Cancer*. **21**: 102-108.

Cruz-Talonia F, Díaz-Perches. 1985. La colposcopia en el estudio de la neoplasia intraepitelial de cuello uterino. *Revista del Hospital General de México*. Vol. XLVI. No. 3. 73-76.

Cullen AP, Raid R, Campion M, Lorincz AT. 1991. Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNA's in intraepithelial and in invasive cervical neoplasm. *Journal of Virology*. **65**: 606-612.

Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L, Vallikad E, Kishna S. 1995. Changes in the physical estate and expresión of human papillomavirus type 16 in the progresión of cervical intraepitelial neoplasia lesions analysed by PCR. *Journal of General Virology*. **76**: 2589-2593.

Daniel B, Rangarajan A, Mukherjee G, Vallikad E, Krishna A. 1997. The link between integrati3n and expression of human papillomavirus type 16 genomes and celular changes in the evolution of cervical neoplastic lesions. *Journal of General Virology*. **78**: 1095-1101.

Danos O, Giri I, Thierry F, Yaniv M. 1984. Papillomavirus genomes: sequences and consequences. *Journal of Investigation on Dermatology*. **83(1suppl)**: 7s-11s.

- Das BC, Sharma JK, Gopalakeishna V, Luthra UK.** 1982. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *Journal of General Virology*. **73**:2327-2336.
- De Caprio JA, Ludlow JW, Figge J, Shew JY, Huang CM, Lee MH, Marsilio E, Paucha E, Livingston DM.** 1988. SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell*. **54**: 275-283.
- De Villiers EM.** 2001. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papillomavirus Report*. **12** : 57-63.
- Demeret C, Le Moal M, Yaniv M, Thierry F.** 1995. Control of HPV18 DNA replication by cellular and viral transcription factors. *Nucleic Acids Research*. **223**: 4777-4784.
- Demeret C, Yaniv M, Thierry F.** 1994. The E2 transcriptional repressor can compensate for Sp1 activation of the human papillomavirus type 18 early promoter. *Journal of Virology*. **68**: 7075-7082.
- Desaintes C, Demeret C.** 1996. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Seminars in Cancer Biology*. **7**: 339-347.
- Di Luca D, Pilotti S, Stefanon B, Rotola A, Monono P, Tognon M, De Palo G, Cassai E.** 1986. Human papillomavirus type 16 DNA in genital tumours: a pathological and molecular analysis. *Journal of General Virology*. **67**: 583-589.
- Dong G, Broker TR, Chow TL.** 1994. Human papillomavirus type 11 E2 proteins

repress the homologous E6 promoter by interfering with the bindings of host transcription factor to adjacent elements. *Journals of Virology*. **68**: 1115-1127.

Doorbar J, Campbell D, Grand RJA, Gallimore PH. 1986. Identification of the human papillomavirus-1a E4 gene product. *European Molecular Biology Organism Journal*. **5**: 355-362.

Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLeon C, Crawford L. 1991. Specific interactions between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. **352**: 824-827.

Dostatni N, Lambert PF, Sousa R, Ham J, Howell PM, Yaniv M. 1991. The functional BPV1 E2 trans-activating protein can act as a repressor by preventing formation of the initiation complex. *Genes Development*. **5**: 1657-1671.

Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissmann L. 1985. The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *Journal of General Virology*. **66**: 1515-1522.

Dowhanick LL, McBride AA, Howley PM. 1995. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus protein E2. *Journal of Virology*. **12**: 7791-7799.

Dyson N, Howell PM, Munger K, Harlow E. 1989. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind the retinoblastoma gene product. *Science*. **243**: 934-937.

Edebiri A. 1990. The relative significance of colposcopic descriptive appearances in the diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia. *International Journal of*

Gynecology and Obstetrics. **33**: 23-32.

Eddy DM. 1987. The frequency of the cervical cancer screening: comparison of a mathematical model with empirical data. *Cancer*. **60**: 1117-1122.

Eisen H. 1984. Inmunología: Introducción a los principios moleculares y celulares de la respuesta inmunitaria. Salvat editores. Barcelona, España.

EI-Diery WS, Tokino T, Velculesco VE, Levy DB, Parsons R, Trent LM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. 1993. Waf1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. **75**: 817-825.

Fassal E, Simmons ME, Kampert JB. 1981. Factors associated with high and low risk of cervical dysplasia. *Journal of the National Cancer Institute*. **66**: 631-636.

Fields BN, Knipe DM, Howell PM y colaboradores (Edts). 1996. Fields Virology. Third edition. Lippincot-Raven Publishers. Philadelphia, U.S. A. 2045-2076.

Funk WD, Pak DT, Karas RH, Wrigth WE, Shay JW. 1992. A transcriptionally active DNA-binding site for human p53 protein complexes. *Molecular Cellular Biology*. **12**: 2866-2871.

Gillette TG, Lusky M, Borowiec JA. 1994. Induction of structural changes in the bovine papillomavirus type 1 origin of replication by the viral E1 and E2 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **91**: 8846-8850.

Gissman L, Wolnik L, Koldovsky U, Schnuch HG, zur Hausen H. 1993. Human papillomavirus type 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas in some cervical cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*. **80**: 560-563.

- Greenough A, Osborne J, Sutherland S.** 1992. Congenital perinatal and neonatal infections. London. Churchill Livingstone.
- González-Garay ML, Barrera-Saldaña HA, Avilés LB, Álvarez-Salas LM, Gariglio P.** 1992. Prevalence in two mexican cities of human papillomavirus DNA sequences in cervical cancer. *La Revista de la Investigación Científica.* **44:** 491-499.
- González-Sánchez JL, Pérez-Guerrero C, Celorio-Aguilera G, Chávez-Brambila J, Ríos Montiel FA.** 1998. Correlación citológica con el sistema Bethesda y la biopsia dirigida por colposcopia. *Ginecología y Obstetricia de México.* **66:** 330-334.
- González-Sánchez JL, Rodríguez SDJ, Menéndez VJ, Pérez HJJ.** 1993. The combined colposcopic index as a diagnostic method in human papillomavirus infection in cervical intraepithelial neoplasia. *Ginecología y Obstetricia de México.* **61:** 72-75.
- Grossman SR, Laimins LA.** 1989a. E6 protein of human papillomavirus type 18 bind zinc. *Oncogene.* **4:** 1089-1093.
- Grossman SR, Mora R, Laimins LA.** 1989b. Intracellular localization and DNA-binding properties of human papillomavirus type 18 E6 protein expressed with a baculovirus vector. *Journal of Virology.* **63:** 366-374.
- Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA.** 1993. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsids proteins. *Journal of Virology.* **67:** 315-322.

- Ham J, Dostatni N, Gautier JM, Yaniv.** 1991. The papillomavirus E2 proteins: a factor with many talents. *Trends in Biochemical Science.* **16:** 440-444.
- Harner DL, Murphy JL.** 1987. Introducción al análisis estadístico. Addison-Wesley Iberoamericana. México, D.,F.
- Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge DJ.** 1993. The p21 cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell.* **75:** 805-816.
- Hedge RS, Grossman SR, Laimins LA, Sigler PB.** 1992. Cristal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus -1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature.* **359:** 505-512.
- Hedge RS, Androphy EJ.** 1998. Crystal structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus type 16: implications for its DNA binding-site selection mechanisms. *Journal of Molecular Biology.* **284:** 1479-1489.
- Hellberg D, Nilsson S.** 1990. 20 years experience of follow-up of the abnormal smear with colposcopic and histology and treatment by conization or cryosurgery. *Gynecology and Obstetrics.* **38:** 118-129.
- Herrero R, Potischman N, Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Tenorio F, De Britton RC, Gailan E.** 1991. A case-control study of nutrients status and invasive cervical cancer I. Dietary indicators. *American Journal of Epidemiology.* **134:** 1335-1346.
- Hernández-Ávila M, Lazcano-Ponce EC, Berúmen-Campos J, Cruz-Valdez A, Alonso-de Ruíz PP, González-Lira G.** 1997. Human papillomavirus 16-18 infections and cervical cancer in Mexico: A case-control study. *Archives of*

Medical Research. **28**: 265-271.

- Hernández-Ávila M, Lazcano-Ponce EC, Alonso-de-Ruiz P, Romieu I.** 1998. Evaluation of the cervical cancer screening programme in Mexico: a population-based case-control study. *International Journal of Epidemiology.* **27**: 370-376.
- Herrero R.** 1990. Sexual behavior, venereal disease, hygiene practices and invasive cervical cancer in high-risk population. *Cancer.* **65**: 380.
- Hildesheim A, Mann V, Brinton LA, Szklo M, Reeves WC, Rawls WE.** 1991. Herpes simplex virus type 2: a possible interaction with human papillomavirus types 16/18 in the development of invasive cervical cancer. *International Journal of Cancer.* **49**:335-340.
- Hines CS, Meghoo C, Shetty S, Biburger M, Brenowitz M, Hedge RS.** 1998. DNA structure and flexibility in the sequence-specific binding of papillomavirus E2 proteins. *Journal of Molecular Biology.* **276**: 809-818.
- Ho, L, Chan S, Chow V, Chong T, Tay S, Villa LL, Bernard H.** 1991. Sequence variants of Human Papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *Journal of Clinical Microbiology.* **29**: 1765-1772.
- Holt SE, Schuller G, Wilson VG.** 1994. DNA binding specificity of the human papillomavirus E1 protein is determined by sequences contained within an 18-base-pair inverted repeat element at the origin of the replication. *Journal of Virology.* **68**: 1094-1102.
- Horwitz BH, Burkhardt AL, Schlegel R, DiMaio D.** 1988. 44 amino acid E5 transforming protein of the bovine papillomavirus requires a hydrophobic

core and specific carboxyl-terminal amino acids. *Molecular Cell Biology*. **8**: 4071-4078.

Howley PM. 1991. Role of human papillomavirus in human cancer. *Cancer Research (suppl.)*. **51**: 5019s-5022s.

Howley PM. 1996. *Papillomavirinae*: The virus and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley OM. *Fields Virology*. Chapter 65. 3rd. Edition. Lippincott Raven Publishers. Philadelphia. U.S.A. 2045-2076 p.p.

Huges FJ, Romanos MA. 1993. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Researches*. **21**: 5817-5823.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howell PM. 1991. A cellular protein mediates association of p53 with the E6 oncoprotein of human papillomaviruses types 16 or 18. *European Molecular Biology Organization Journal*. **10**: 4129-4935.

Huibregtse JM, Scheffner M, Howell PM. 1994. E6-AP directs the HPV E6-dependent inactivation of p53 and is representative of a family of structurally and functionally related proteins. *Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology*. **59**: 237-345.

Innis MA, Gelfand DH, Snisky JJ, White TJ. (Eds.). 1990. PCR protocols. A guide to methods and applications. Academic Press U.S.A. 3-12 p.p.

Jeon S, Allen-Hoffman BL, Lambert PF. 1995. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells. *Journal of Virology*. **5**: 2989-2997.

Jenison SA, Yu XP, Valentine JM, Koutsky LA, Christiansen AE, Beckmann AM, Galloway DA. 1990. Evidence of the prevalent genital-type human

papillomavirus infections in adult and children. *The Journal of Infectious Diseases*. **162**: 60-69.

Jones HW III. 1990. Cervical intraepithelial neoplasia. En Jones HW III, Wentz A, Burnett L. *Novak's Treatise of Gynecology*. Chapter 26. Sans Tache. U.S.A. 517-602 p.p.

Jonsson M, Karlson R, Evander M, Gustavson A, Rylander E, Wadell G. 1997. Acetowithening of the cervix and vulva as a predictor of subclinical human papillomavirus infections : sensitivity and specificity in a population-based study. *Obstetrics and Gynecology*. **90**: 744-747.

Jordan SW, Key CR. 1981. Carcinoma of cervix in Southwestern americans indians: results of a cytologic detection programme. *Cancer*. **47**: 2523-2532.

Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kistensen G, Holm R, Johanson B and Hagmar B. 1996. Use of multiple PCR primers sets for optimal detection of Human Papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**: 2095-2100.

Kaye JN, Cason J, Pakarian FB, Jewers RJ, Kell B, Bible J, Raju KS, Best JM. 1994. Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. *Journal of Medical Virology*. **44**: 415-421.

Kaufman RH, Adam E. 1999. Is human papillomavirus testing of value in clinical practice?. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **180**: 1049-1053.

Kennedy JB, Neville AM. 1982. Estadística para ciencias e ingeniería. Harla. México, D.,F.

- Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingan S, Seymour A, Kinzle KW, Vogelstein B.** 1992. Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. *Science*. **256**: 826-830.
- Kessler II.** 1976. Human cervical cancer as a venereal disease. *Cancer Research*. **36**: 783-791.
- Kesler II.** 1981. Etiologic concepts in cervical carcinogenesis. *Gynecology and Oncology*. **12**: S7-S24.
- Kiviat NB, Koutsky LA, Paavonen JA, Galloway DA, Critchlaw CW, Becnab AM, McDougall JK, Peterson ML, Stevens CE, Lipinski CM, Holmes KK.** 1989. Prevalence of genital papillomavirus interactions among woman attending a college student health clinic or a sexuality transmitted disease clinic. *Journal Infectious Diseases*. **159**: 293-302.
- Kirnbahuer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT.** 1992. Papillomavirus L1 mayor capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **89**: 1218-1284.
- Koss LG.** 1989. The Papanicolaou test for cervical detection. A triumph and a tragedy. *Journal of the American Medical Association*. **261**:737-743.
- Krajinovic M, Lazic J, Stanimirovic B, Diklic V, Savic A.** 1993. The E2 region of HPV 16 in relation to different types of cervical lesions. *Journal of Medical Virology*. **41**: 1-5.
- Kulke R, DiMaio.** 1991. Biological properties of the deer papillomavirus E5 gene in mouse C123 cells: grow transformation, induction of DNA synthesis and activation of the platelet-derived grow factor receptor. *Journal of Virology*.

65: 4943-4949.

Kwok S, Higuchi R. 1989. Avoiding false positivities with PCR. *Nature*. **338**: 237-238.

La Vecchia C, Francheschi S, Decarli A, Fasolo M, Gentile A, Tognoni G. 1984. Pap smear and the risk of cervical neoplasia quantitative estimates from a case control study. *Lancet*. **i**: 779-782.

Lazcano-Ponce EC, Hernández-Ávila M, López-Carrillo L, Alonso-de-Ruiz P, Torres-Lobatón A, González-Lira G, Romieu Y. 1995. Factores de riesgo reproductivo e historia de vida sexual asociados al cáncer cervical en México. *La Revista de la Investigación Científica*. **47**: 337-512.

Lazcano-Ponce EC, Rascón-Pacheco RA, Lozano-Asencio R, Velazco-Mondragón HE. 1996a. Mortality from cervical carcinoma in Mexico. *Acta Cytologica*. **40**: 506-512.

Lazcano-Ponce EC, Nájera-Aguilar P, Alonso-de-Ruiz P, Buiatti E, Hernández-Ávila M. 1996b. Programa de detección oportuna del cáncer cervical en México I. Diagnóstico situacional. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. **42**: 123-140.

Lazcano-Ponce EC, Nájera-Aguilar P, Alonso-de Ruiz P, Buiatti E, Hernández-Ávila M. 1996c. Programa de detección oportuna del cáncer cervical en México II. Propuesta de reorganización. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. **42**: 141-158.

Lazcano-Ponce EC, Alonso-de-Ruiz P, López-Carrillo L, Nájera-Aguilar P, Ávila-Ceniceros R, Escandón-Romero C, Cisneros MT, Hernández-Ávila M. 1997. Validity and reproductibility of cytologic diagnosis in a

sample of cervical cancer screening centers in Mexico. *Acta Cytologica*. **41**: 277-284.

Lazcano-Ponce EC, Moss S, Alonso-de-Ruiz P, Salmerón-Castro J. Hernández-Ávila M. 1999. Cervical cancer screening in developing countries: Why is it ineffective? The case of Mexico. *Archives of Medical Research*. **30**: 240-250.

Leechanachai T, Banks L, Moreau F, Matlashewski G. 1992. The E5 gene from human papillomavirus type 16 is an oncogene which enhances growth factor-mediated signal transduction to the nucleus. *Oncogene*. **7**: 19-25.

Lehn H, Villa LL, Marziona F, Hilgart M, Hillemans HG, Sauer G. 1988. Physical state and biological activity of human papillomavirus genomes in precancerous lesions of the female genital tract. *Journal of General Virology*. **69**: 187-196.

Leptak C, Ramón y Cajal S, Kulke R, Horwitz BH, Reise DJ 2d, Dotto GP, Di Maio D. 1991. Tumorigenic transformation of murine keratinocytes by the E5 genes of bovine papillomavirus type 1 and human papillomavirus type 16. *Journal of Virology*. **65**: 7078-7083.

Li R, Botchman MR. 1993. The acidic transcriptional activation domains of VPH16 and p53 bind the cellular replication protein A and stimulate *in vitro* BPV1 DNA replication. *Cell*. **73**: 1207-1221.

Liu JS, Kuo SR, Broker TR, Chow LT. 1995. The functions of human papillomavirus type 11 E1 and E2C proteins in cell-free replication. *Journal of Biology and Chemistry*. **270**: 27283-27291.

Lovejoy N, Anastasi J. 1994. Squamous cell cervical lesions in women with and

- without AIDS. Biochemical risk factors, prevention and policy. *Cancer Nursing*. 17: 294-307.
- Lyon JL, Gardner JW, West DW, Stanish WM, Hebertson RM.** 1983. Smoking and carcinoma *in situ* of the uterine cervix. *American Journal of Public Health*. 151: 612-616.
- Magrath Y, Litvak J.** 1993. Cancer in developing countries: opportunity and challenge. *Journal of the National Cancer Institute*. 85: 862-874.
- Maiman M, Tarricone N, Vieira J.** 1991. Colposcopic evaluation of human immunodeficiency virus sero-positive women. *Obstetrics and Gynecology*. 78: 84-88.
- Manos MM, Ting Y, Wrigth DK, Lewis AJ, Broker TR and Wolinsky SM.** 1989. Use of polymerase chain reaction amplification for detection of genital human papillomaviruses. *Cancer cells*. 7: 209-214.
- Matas A, Simmons R, Kjellstrand C.** 1975. Increased incidence of malignancy during chronic renal failure. *Lancet*. 1: 883-885.
- May M, Doug XP, Beyer-Finkler E, Stubenrauch F, Fuchs PG, Pfister H.** 1994. The E6/E7 promotor of extrachromosomal HPV 16 DNA in cervical cancer escapes from cellular repression by mutation of target sequences for YY1. *European Molecular Biology Organization Journal*. 13: 1460-1466.
- McBride AA, Romanczuk H, Howley PM.** 1991. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *Journal of Biological Chemistry*. 266: 18411-18414
- McCord M, Stoval T, Summit R, Ling F.** 1991. Discrepancy of cervical cytology and colposcopic biopsy: is cervical conization necessary? *Obstetrics and*

Gynecology. 77:715.

McDonnel PJ, Mc Donnel JM, Kessis T, Green WR, Sha KV. 1987. Detection of human papillomavirus type 6/11 DNA in conjuntival papillomas by *in situ* hidridization with radioactives probes. *Human Pathology*. 18: 1115-1119.

Medina MO, Morales PN, Yaniv M, García CA, Thierry F. 1996. A single element mediates glucocorticoids hormones response of HPV 18 with no functional interactions with AP1 or hbrm. *Virology*. 217: 392-396.

Meisels A, Morin C. 1997. Cytopathology of the uterus. 2nd edition. American Society of Clinical Pathologists.

Melamed MR, Flehinger BJ. 1973. Early incidence rates of precancerous cervical lesions in women using contraceptives. *Gynecology and Oncology*. 1: 290-298.

Melnick JL, Rawis WE, Adam E. 1991. Cervical cancer. In Evans AS (Ed). *Viral infections of humans. Epidemiology and control*. Chapter 26. Plenum Medical Book Company. USA. 687-711 p.p.

Miessels A, Fortin R. 1976. Condylomatous lesions I: Cytologic patterns. *Acta Cytologyca*. 20: 505-509.

Miessels A, Fortin R. 1977. Condylomatous lesions II: Cytologic and colposcopy and hystopatology study. *Acta Cytologyca*. 21: 379-390.

Miessels A, Begin R, Schneider V. 1977. Dysplasias of the cervix uterine. Epidermiological aspects: role of age at first coitus and use of oral contraceptives. *Cancer*. 40: 3076-3081.

- Mitchell MF, Schottenfeld S, Tortolero-Luna G, Cantor SB, Richards-Kortum R.** 1998. Colposcopy for the diagnosis of squamous intraepithelial lesions: A meta-analysis. *Obstetrics and Gynecology*. **91**: 626-631.
- Miyasaka M, Takami Y, Inove H, Hakura A.** 1991. Rat primary embryo fibroblast cells suppress transformation by the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 in somatic hybrid cells. *Journal of Virology*. **65**: 479-482.
- Morrison EAB.** 1994. Natural history of cervical infection with human papillomaviruses. *Clinical Infectious Diseases*. **18**: 172-180.
- Mosciki AB, Broerong J, Powell K, Kléin J, Clayton L, Smith G, et al.** 1993. Comparison between colposcopic, cytologic and hystologic findings women positive and negative for human papillomavirus DNA. *Journal of Adolescents Healt*. **14**: 74.79.
- Moskaluk CA, Bastia D.** 1987. The E2 "gene" of bovine papillomavirus encodes an enhancer binding protein. *Proccedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **84**: 1215-1218.
- Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howell PM.** 1992. Interactions of HPV E6 and E7 with tumor suppressor gene products. *Cancer Survey*. **12**: 197-217.
- Muñoz N, Bosck FX.** 1997. Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Pública de México*. **39**: 274-282.
- Myers G, Baker C, Münger K, Sverdrup F, McBride A, Bernard HV, Meissner J. (Eds.)** 1997. Human papillomaviruses: a compilation and analysis of nucleics acids and amino acids sequences. Los Álamos National

Laboratory. Los Álamos, New Mexico. USA.

Nakai Y, Lancaster W, Jenson A. 1987. Purification of papillomavirus structural polypeptides from papillomas by immunoaffinity chromatography. *Journal of General Virology*. **68**: 1891-1896.

Okada K, Kamiyama I, Inomata M, Imai M, Miyakawa Y, Mayumi M. 1976. E antigen y anti-e in the serum asymptomatic carriers mothers as indicators of positive and negative transmission of hepatitis B virus to theirs infants. *New Inglad Journal of Medicine*. **249**: 746-749.

Old RW, Primrose SB. 1985. Técnicas básicas: Electroforesis en geles de agarosa. En *Principios de manipulación genética*. Acribia. Zaragoza, España. 5-7 p.p.

Oriel JD. 1971. Natural history of genital warts. *British Journal of Venereal Disease*. **47**: 1-13.

Orth G, Jablonska S, Favre M, Croissant O, Jarzabek-Chorzelsk M, Rzesza G. 1978. Characterization of two types of human papillomaviruses in lesions of epidermodysplasia verruciformis. *Proccedings on the National Academy of Sciences USA*. **75**: 1573-1541.

Ohto H, Terazawa S, Sasaki N, Hino K, Ishiwata C, KAKo M, Ujiie N, Endo C, Matsui A, Okamoto H, Mishiro S. 1994. Transmission of hepatitis C virus from mothers to infants. *New Inglad Journal of Medicine*. **330**: 744-750.

Ottaviano M, La Torre P. 1982: Examination of tje cerviz with the naced eye using acetic test. *American Journal of Obstetrice and Gynecology*. **143**: 139-142.

Oyensanya OA, Ameridinghe CN, Manning EAD. 1993. Outpatient excisional

management of cervical intraepithelial neoplasia: a prospective, randomized comparison between loop diathermy excision and laser excisional conization, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **168**: 485-488.

Pahel G, Aulabaugh A, Short S, Barnes J, Painter G, Ray P, Phelps W. 1993. Structural and functional characterization of the HPV 16 E7 protein expressed in bacteria. *Journal of Biology and Chemistry*. **268**: 26018-26065.

Paquette RI, YY Lee, SP Wilczynski, A Karmakar, M Kizaki, CW Miller and HP Koeffler. 1993. Mutations of p53 and Human Papillomavirus infection in cervical carcinoma. *Cancer*. **72**: 1272-1280.

Park TW, Fujiwara H, Wright TC. 1995. Molecular Biology of cervical cancer and its precursors. *Cancer Supplement*. **76**: 19902-1913.

Parkin DM, Muir CS, Whelan SL. 1992. Cancer incidence in five continents. Comparability and quality of data. *IARC. Scientific Publications*. **120**: 45-173.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. 1993. Estimates of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *International Journal of Cancer*. **54**: 594-606.

Piccini A, Storey A, Massimi P, Banks L. 1995. Mutations in the human papillomavirus type 16 E2 protein identify multiple regions of the protein involved in binding to E1. *Journal of General Virology*. **76**: 2909-2913.

Ponten J, Adami HO, Bergström R, Dillner J, Friberg LG, Gustafsson L, Miller AB, Parkin DM, Sparén P, Trichopoulos D. 1995. Strategies for global control of cervical cancer. *International Journal of Cancer*. **60**: 1-26.

- Porreco R, Penn I, Droegemueller W.** 1975. Gynecologic malignancies in immunosuppressed organ homograft recipients. *Obstetrics and Gynecology*. **45**: 359-364.
- Potischam N, Brinton LA.** 1996. Nutrition and cervical neoplasia. *Cancer causes and control*. **7**: 113.
- Priddan H, Lilienfeld AM.** 1971. Carcinoma of the cervix in Jewish women in Israel. *Israel Journal of Medical Science*. **7**: 1465-1470.
- Rank NM, Lambert PF.** 1995. Bovine papillomavirus type 1 E2 transcriptional regulators directly bind two cellular transcription factors: TFIID and TFIIB. *Journal of Virology*. **69**: 6323-6324.
- Reeves WC, Brinton LA, García M, Brenes MM, Herrero R, Gaytán E, Tenorio F, de Brinton RC Rawis WE.** 1989. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *The New England Journal of Medicine*. **320**: 1437-1441.
- Reid R, Scalzi P.** 1985. Genital warts and cervical cancer VII. An improved colposcopic index for differentiating benign papillomaviral infections from high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **153**: 611-618.
- Reid R, Herschman BR, Crum CP, Agronow SJ, Stanhope R.** 1984. Genital warts and cervical cancer V. The tissue basis of colposcopic change. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **149**: 293-303.
- Remm M, Brain R, Jenkins JR.** 1992. The E2 binding sites determine the efficiency of replication for the origin of human papillomavirus type 18. *Nucleic Acids Research*. **20**: 6015-6021.

Richart RM. 1995. Screening: the next century. *Cancer*. **76 (supp)**: 1919-1927.

Roberts D, Ashmole I, Johnson GP, Kreider JW, Gallimore PH. 1993. cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology*. **197**: 176-187.

Roberts D, Ashmole I, Gibson LJ, Rookes SM, Barton GJ, Gallimore PH. 1994. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important on the formation of cytoplasmic E4/Cytoqueratin networks in epithelial cells. *Journal of Virology*. **68**: 6432-6445.

Rocha-Zavaleta L. 1996. Immune response to human papillomavirus (HPV) in cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia. *Ph. D. thesis*. Paterson Institute for Cancer Research. University of Manchester. England.

Rocha-Zavaleta L, Jordan D, Pepper S, Corbitt G, Clarke F, Maintland NJ, Sanders CM, Arrand JR, Stern RL, Stacey SN. 1997. Differences in serological IgA responses to recombinant baculovirus-derived human papillomavirus E2 protein in the natural history of cervical neoplasia. *British Journal of Cancer*. **75**: 1144-1150.

Rodríguez-Peral J. 1983. Carcinoma cervicouterino en el noroeste de México: aspectos clínicos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*. **21**: 183-189.

Rogel-Gaillard C, Pehau-Arnaudet G, Breitburd F, Orth G. 1993. Cytopathic effect in human papillomavirus type 1 inclusion warts *in vitro* analysis of the contribution of two forms of the viral E4 proteins. *Journal of Investigation in*

Dermatology. **101**: 843-851.

Roitt I, Brostoff J, Male D. 1998. Immunology. 5th. edition. Mosby. London. UK.

Romanczuk H, Howley PM. 1992. Disruption of the either E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.* **89**: 3159-3263.

Romer AS, Parsons TS. 1981. Anatomía comparada 5a. edición. Nueva Editorial Interamericana. México, D.,F.

Rose RC, Bonnez W, Reichman RC, Garcea RL. 1993. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: *in vivo* and *in vitro* assembly of virus particles. *Journal of Virology*. **67**: 1936-1944.

Ruíz MJ, García P. 1985. El papel de la colposcopia en el diagnóstico de la neoplasia intraepitelial del cérvix. *Ginecología y Obstetricia de México*. **53**: 115-120.

Saiki RK, Bugawan TL, Horn GTR, Mullis KB, Erlich HA. 1986. Analysis of enzymatically amplified β -globin en HLADQ α DNA with allele-specific oligonucleotides probes. *Nature*. **324**: 163-166.

Salmerón-Castro J, Lazcano-Ponce EC, Hernández-Ávila M. 1996. Programa de Detección Oportuna del Cáncer en instituciones de seguridad social. Una alternativa organizacional. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. **42**: 159-165.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

- Sánchez Feliciano.** 1998. Subsecretario de Salud. Conferencia de apertura del IV Curso Internacional de Biomedicina Molecular. Escuela Superior de Enfermería y Obstetricia-IPN. 28-30 de octubre. Secretaría de Salud.
- Sánchez-Pérez A, Soriano S, Anthony R, Gaston C, Gaston K.** 1997. Disruption of the human papillomavirus type 16 E2 gene protects cervical carcinoma cells from E2F-induced apoptosis. *Journal of General Virology.* **78:** 3009-3019.
- Sanders CM, Stern PL, Maitland NJ.** 1995. Characterization of human papillomavirus type 16 E2 protein and subdomains expressed in cells insects. *Virology.* **211:** 418-433.
- Sedlacek TV, Lindheims S, Eder C, Hasty L, Wooland M, Ludomirsky A, Rando RF.** 1989. Mechanims for human papillomavirus transmission at birth. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* **161:** 55-59.
- Sedman J, Stenlud A.** 1995. Co-operative interaction between the iniciator E1 and the transcriptional activator E2 is required for replicator specific DNA replication of bovine papillomavirus *in vivo* and *in vitro*. *European Molecular Biology Organizations Journal.* **14:** 6218-6228.
- Sedman J, Stenlud A.** 1996. The initiator protein E1 binds to the bovine papillomavirus origin of replication as a trimeric ring-like structure. *European Molecular Biology Organization Journal.* **15:** 5085-5092.
- Seo YS, Müller F, Luský M, Hurwitz J.** 1993. Bovine papillomavirus (BPV)-encoded E1 protein contains multiple activities required for BPV DNA replication. *Proccedings of the National Academy of Sciences.* **90:** 702-706.

- Schachter J, Hill EC, King EB, Coleman BR, Jones P, Meyer KF.** 1975. Chlamidial infection in women with cervical dysplasia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* **123:** 753-757.
- Scheffner M, Werbess BA, Huibregtse JA, Levine AJ, Howell PM.** 1990. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* **63:**1129-1136.
- Schlegel R, Wade-Glass M, Rabson MS, Yang YC.** 1986. The E5 transforming gene of bovine papillomavirus encode small hydrophobic polypeptide. *Science.* **233:** 464-647.
- Schneider V, Kay S, Lee H.** 1983. Immunosuppression as a high risk factor in the development of condyloma acuminatum and squamous neoplasia of the cervix. *Acta Cytologica.* **27:** 220-224.
- Schneider A, Sterzink K, Buck G, de Villers EM.** 1988. Colposcopy superior to cytology for the detection of early genital human papillomavirus infection. *Obstetric and Gynecology.* **71:** 236.
- Sillman F, Staneck A, Sedlis A.** 1984. The relationship between human papillomavirus and lower genital intraepithelial neoplasia in immunosuppressed women. *American Journal of the Obstetrics and Gynecology.* **150:** 300-308.
- Snustad DP, Simmonds MJ, Jenkins JB.** 1997. Principles of Genetics. John Wiley and Sons. U.S.A.
- Snijders PJF, van den Brule AJC, Schrijnemakers FJ, Snaw G, Meijer CJM, Walboomers JMM.** 1990. The use of general primers in the polymerase chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human

papillomavirus genotypes. *Journal of General Virology*. **71**: 173-181.

Spitzer M, et al. 1987. Comparative utility of repeat Papanicolaou smears, cervicography and colposcopy in the evaluation of atypical Papanicolaou smears. *Obsterice and Gynecology*. **69**: 731.

StagoS, Pass RF, Cloud G, Britt WJ, Henderson RE, Walton PD, Veren DA, Page F, Alford CA. 1986. Primary cytomegalovirus infections in pregnancy. Incidence, transmissions to fetus and clinical outcome. *Journal of the American Medical Association*. **256**: 1904-1908.

Stern E, Forsythe AB, Youkeles L, Coffelt CF. 1977. Steroid contraceptives use and cervical dysplasia: increased risk of progression. *Science* **196**: 1460-1462.

Stone KM. 1989. Epidemiologic aspects of genital HPV infection. *Clinical Obstetrics and Gynecology*. **32**: 112-116.

Storey A, Greenfield I, Banks L, Pim D, Crook T, Crawford L, Stanley M. 1992. Lack of immortalizing activity of a human papillomavirus type16 variant DNA with a mutation in the E2 gene isolated from normal human cervical keratinocytes. *Oncogene*. **7**: 459-465.

Storey A, T Miranda, A Kalita, C Harwood, D Gardiol, F Mantovani, J Breuers, IM Leig, G Matlashewski, and L Banks. 1998. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. **393**: 229-234.

Storey A, Pim D, Murray A, Osborn K, Banks L, Crawford L. 1988. Comparison of the *in vitro* transformation of human papillomavirus types. *European*

Molecular Biology Organization Journal. 7: 1815-1820.

Straight SW, Hinkle PM, Jewers RJ, McCance DJ. 1993. The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 transforms fibroblasts and affects the downregulation of the epidermal growth factor receptor in keratinocytes. *67*: 4521-4532.

Swan DC, Vernon SD, Icenogle JP. 1994. Cellular proteins involved in papillomavirus-induced transformation. *Archives of Virology*. **138**: 105-115.

Tan SH, Leong LEC, Walker PA, Bernard HU. 1994. The human papillomavirus type 16 E2 transcription factor binds with low cooperativity to two flanking sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *Journal of Virology*. **68**: 6411-6420.

Takami Y, Sasagawa T, Sudiro T, Yutsudo M, Hakura A. 1992. Determination of the functional differences between human papillomavirus type 6 and 16 E7 proteins by their 30N-terminal amino acid residues. *Virology*. **186**: 489-495.

Terry G, Ho L, Cuzick J. 1997. Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA DR/DQ type. *International Journal of Cancer*. **73**: 651-655.

The Big Picture Book of Viruses. 15/01/2003. [online]. <http://www.tulane.edu> © 1995.

Thierry F, Spyrou G, Yaniv M, Howell PM. 1992. Two Ap1 sites binding Jun B are essential for HPV 18 transcription in keratinocytes. *Journal of Virology*. **66**: 3740-3748.

Thorner LK, Lim DA, Botcham MR. 1993. DNA-binding domain of bovine papillomavirus type 1 E1 helicase: structural and functional aspects. *Journal*

of Virology. **67**: 6000-6014.

Tomatis L, Day NE (Eds). 1990. Cancer: causes, occurrence and control. IARC Scientific Publications. No. 100. Lyon IARC.

Tornesello ML, Bouraguro FM, Meglio A, Bounaguoro L, Beth-Giraldo E, Giraldo E. 1997. Sequence variants and viral genomics state of human papillomavirus type 16 in penile carcinomas from ugandan patiens. *Journal of General Virology*. **78**. 2199-2208.

Torres-Lobatón A, Román-Bassaure E, Martínez-Macías R, Cruz-Talonia F. 1987. Cáncer cervicouterino: evidencias a favor de una etiología multifactorial. *Ginecología y Obstetricia de México*. **55**: 11-22.

Torres-Lobatón A, Cruz-Talonia F, Plata-Nuñez P, Pérez-Villanueva HJ, García-González H, Román-Bassaure E, Hernández-Aten D. 1988. Cáncer cervicouterino 1983-1984. Experiencia de la Unidad de Oncología del Hospital General de México S.S. *Revista del Instituto Nacional de Cancerología*. **34**: 617-622.

Tovell H, Banogan P, Nash A. 1976. Cytology and colposcopy in the diagnosis and management of preclinical carcinoma of the cervix uteri: a learning experience. *American Journal of Obstetrice and Gynecology*. **124**: 924.

Ustav M, Stenlund A. 1991. Transient replication of BPV-1 requires two viral polypeptides encoded by the E1 and E2 open reading frames. *European Molecular Biology Organization Journal*. **10**: 449-457.

van Le L, Broekhoizen FF, Janzer-Steele R, Behar M, Samter T. 1993. Acetic visualization of the cervic to detec cervical dysplasia. *Obstetrice and Gynecology*. **81**: 293-295.

- Vasconcelos-Allende M, Aranda C, Ruíz-Moreno JA, Paz-Fuentes E.** 1992. Búsqueda, detección y control del virus del papiloma humano (V.P.H.). *Ginecología y Obstetricia de México.* **60:** 37-41.
- Valcárcel-Casas M, Gómez-Hernández A.** 1990. Electroforesis. En: *Técnicas analíticas de separación.* Reverté. Barcelona, España. 109-147 p.p.
- Veress G, SZarka K, Dong XP, Gergely L, Pfizer H.** 1999. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *Journal of General Virology.* **80:** 1035-1043.
- Vermund S, Kelly K, Klein R.** 1991. High risk of human papillomavirus infection and cervical squamous intraepithelial lesions among women with symptomatic human immunodeficiency virus infection. *American Journal of the Obstetrics and Gynecology.* **165:** 392-400.
- Vernon SD, Unger ER, Millar DL, Lee DR, Reeves WC.** 1997. Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *International Journal of Cancer.* **74:** 50-56.
- von der Meden-Alarcón J, Ruíz-Moreno JA, García-León JF, Kably-Ambe A.** 1995. Correlación cito-colposcópica-histopatológica de lesiones cervicales preinvasoras e infección cervical por virus del papiloma humano. *Ginecología y Obstericia de México.* **63:** 365-371.
- Walboomers JMM, Meijer CJLM.** 1997. Do HPV-negative cervical carcinoma exist? *Journal of Pathology.* **181:** 253-254.
- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Keerti VS,**

- Snijders JF, Peto J, Meijer CJL, Muñoz N.** 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *Journal of Pathology*. **189**: 12-19.
- Werness BA, Levine AJ, Howell PM.** 1990. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. **248**: 76-79.
- Wetrich D.** 1986. Analysis of the factor involved in the colposcopic evaluation of 2149 patients with abnormal Papanicolaou smears. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **154**: 1339-1345.
- Whitley RJ.** 1993. Neonatal herpes simplex virus infections. *Journal of Medical Virology supplement*. **1**: 13-21.
- Whyte P, Buchovich KJ, Horowitz JM, Freind SH, Raybuck M, Weinberg RA, Harlow E.** 1988. Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1a binds to the retinoblastoma gene product. *Nature*. **334**: 124-129.
- Xiong Y, Hanong GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi P, Beach D.** 1993. P21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature*. **336**: 701-4.
- Zhou J, Sun XY, Stenzel DJ, Frazer IH.** 1991. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology*. **185**: 251-257.
- zur Hausen H.** 1991 a. Virus in human cancers. *Science*. **254**: 1167-1173.
- zur Hausen H.** 1991b. Human papillomavirus in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology*. **184**: 9-13.

XI. GLOSARIO

Anaplasia Es el proceso en el que las células malignas sufren una regresión hacia células primitivas poco diferenciadas.

Biopsia Pequeña muestra de tejido extraída mediante procedimiento quirúrgico.

Cáncer Es el nombre común que se aplica a las neoplasias malignas.

Canal endocervical Conducto cervical que conecta a la cavidad uterina con la vagina.

Choque térmico Cambio brusco de temperatura que desnaturaliza la estructura tridimensional de las proteínas.

Coilocito Los coilocitos son células que presentan una zona perinuclear de borde definido rodeada por citoplasma anfófilo denso.

Colposcopia Observación del cérvix uterino mediante un colposcopio.

Densidad óptica Capacidad específica de absorción de la luz por una sustancia química dada.

Desproteización Es la eliminación de las proteínas contenidas en una solución acuosa.

Displasia Es la pérdida del patrón celular normal, con pérdida tanto del patrón de orientación como de la uniformidad. Se presenta con mayor frecuencia en epitelios.

Hiperplasia Se refiere al aumento del número de células y se presenta en órganos y tejidos cuyas células tienen capacidad mitótica.

Hipertrofia Estado en el que las células se agrandan, trayendo como consecuencia, la apariencia de aumento de tamaño en un órgano o tejido.

Histopatología Estudio de la estructura y desarrollo de las células en un tejido dado.

Metaplasia Es la sustitución de una variedad de células maduras por otro tipo de células también maduras.

Multiparidad Dos o más partos en una mujer.

Neoplasia Se define como la proliferación anormal de tejido nuevo caracterizado por un crecimiento no controlado y que es agresivo para el hospedero.

Núcleos picnóticos Núcleos celulares atrofiados y en proceso de muerte.

Oligonucleótidos Pequeña secuencia de DNA que actúa como iniciador de la replicación.

Polimerasas Proteína encargada de unir subunidades de una macromolécula orgánica.

Termoestable Sustancia química resistente a cambios bruscos de temperatura.

Unión escamo-columnar Sitio de interacción del epitelio columnar simple secretor de moco al exterior del cérvix y el epitelio escamoso estratificado no queratinizado de la parte anterior del cérvix.

XII. PROTOCOLOS

PBS Buffer salino fosfatado 1000 ml

		<u>1X</u>	<u>10X</u>
KCl	Cloruro de Potasio	0.20 g	2.0 g
NaCl	Cloruro de Sodio	8.00 g	80.0 g
KH₂PO₄	Fosfato de Potasio	0.24 g	2.4 g
Na₂HPO₄	Fosfato de Sodio dibásico	1.44 g	14.4 g

Disolver el KCl, el NaCl, el KH₂PO₄ y el Na₂HPO₄ en 800 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 7.4. Aforar a 1000 ml y alicuotar la solución para su esterilización en autoclave a 15 lb/sq en ciclo líquido. Almacenar a temperatura ambiente.

TBE Buffer Tris borato EDTA 1000 ml

	<u>1X</u>	<u>5X</u>	<u>10X</u>
0.45 M Tris-base	5.45 g	27.25 g	54.5 g
0.45 M ácido bórico	2.78 g	13.90 g	27.8 g
0.001 M EDTA	0.37 g	1.85 g	3.7 g

Disolver el Tris-base, el ácido bórico en 800 ml de agua desionizada. Agregar el EDTA y ajustar el pH a 8.0. Aforar a 1000 ml y alicuotar la solución para su esterilización en autoclave a 15 lb/sq en ciclo líquido. Almacenar a temperatura ambiente. Antes de utilizar en electroforesis ajustar el pH a 8.0 con ácido bórico 1M.

TE
Buffer Tris-HCl EDTA (pH 8.0)
1000 ml

		<u>1X</u>	<u>10X</u>
10 mM	Tris-HCl	1.21 g	12.11 g
1 mM	EDTA	0.37 g	3.73 g

Disolver el Tris-HCl, el EDTA, en 800 ml de agua desionizada y ajustar el pH a 8.4. Aforar a 1000 ml y alicuotar la solución para su esterilización en autoclave a 15 lb/sq en ciclo líquido. Almacenar a temperatura ambiente.

El pH de las soluciones Tris es termodependiente y disminuye aproximadamente 0.03 unidades de pH por cada grado que se incrementa la temperatura. Por ejemplo, una solución 0.05 M tiene un valor de pH de 9.5, 8.9 y 8.6 a 5, 25 y 37° C, respectivamente.

Buffer de digestión
100 ml

		<u>1X</u>
50 mM	Tris-HCl	0.790 g
1 mM	EDTA	0.0037 g
0.5%	Tween 20	5.000 g

Disolver el el Tris-HCl, el EDTA y el Tween 20 en 80 ml de agua desionizada y se afora a 100 ml. Se alícuota la solución para su esterilización en autoclave a 20 lb/sq en ciclo líquido. Almacenar a 4° C.

Buffer gel loading
Tipo III
100 ml

0.25 %	Azul de bromofenol	0.25 g
0.25%	Xilencianol FF	0.25 g
45.00%	Glicerol puro	45.00 g

Disolver los colorantes en 20 ml de agua destilada estéril con un agitador magnético hasta asegurarse de que se disuelvan por completo (si es necesario, agregar otros 20 ml de agua). Se agrega poco a poco el glicerol manteniendo la agitación y se afora a 100 ml, se alícuota la cantidad necesaria y se almacena junto con el stock a temperatura ambiente.

Este buffer sirve para tres propósitos: incrementar la densidad de la muestra asegurando que el DNA siempre caiga en el pozo; agregar color a la muestra, simplificando así el proceso de corrimiento; y, que los colorantes que contienen se muevan hacia el ánodo a tasas predecibles en un campo eléctrico. El azul de bromofenol migra a través de los geles de agarosa a aproximadamente 2.2 veces más rápido que el Xilencianol FF, independientemente de la concentración de agarosa. El azul de bromofenol, en los geles de agarosa que se corren en TBE 0.5X, migra a aproximadamente la misma tasa que un DNA lineal bicatenario de 300 pb de longitud, mientras que el Xilencianol FF lo hace a la misma tasa que migraría un DNA lineal bicatenario de 4 Kb de longitud. Esta relación no es afectada significativamente por la concentración de agarosa en geles con rangos de concentración entre los 0.5% y el 1.4%.

Bromuro de Etidio
10 mg/ml

Se agrega 1 g de bromuro de etidio a 100 ml de agua destilada estéril. Se mantiene en agitación con un agitador magnético durante algunas horas hasta asegurarse que el colorante se haya disuelto. Se envuelve el contenedor de la solución en papel aluminio o se transfiere la solución a una botella oscura y se almacena a temperatura ambiente.

Precaución: El bromuro de etidio, es un poderoso mutágeno y es moderadamente tóxico. Deben utilizarse guantes de látex cuando se trabaje con soluciones que contengan este colorante y mascarilla ó cubrebocas cuando se pese.

dNTP's 2 mM
3 ml

Se toman 60 μ l de cada dNTP 100 mM Gibco BRL (dATP, dTTP, dGTP y dCTP) y se colocan en un tubo Falcon estéril nuevo, contenido en un baño de hielo. Se le agregan 2760 μ l de agua inyectable (ampolleta cerrada) y se agita a intervalos de 15 segundos en un vórtex durante un minuto, cuidando de volver a poner el tubo en el hielo, entre cada agitación. Después se alícuota a -20° C.

Proteinasa K
16.5 mg/ml

Se disuelve la proteinasa K en el buffer de reconstitución y almacenarse a 20° C. La proteinasa K es una serinproteasa inespecífica, que no es inactivada por iones metálicos, agentes quelantes (como el EDTA), reactivos sulfidrílicos o por inhibidores de tripsina o quimiotripsina. Es estable en un amplio rango de pH (4-12.5), con una actividad óptima a pH 6.5-9.5. Su actividad puede aumentarse agregando agentes desnaturizantes (como el SDS y la urea). La temperatura óptima de la enzima es de 65° C, cuando la temperatura alcanza los 95 °C ocurre una rápida desnaturización de esta enzima.

Buffer de reconstitución
100 ml

<u>1X</u>		
10 mM	Tris-HCl	0.16 g
20 mM	CaCl ₂	0.15 g
50%	Glicerol puro	50 ml

Se disuelven el Tris-HCl y el CaCl₂ en 40 ml de agua desionizada y se agrega poco a poco el glicerol. Una vez disueltos los componentes, se agrega a 100 ml y se almacena a 4° C.

Cloroformo:alcohol isoamílico
25:1

24 ml	Cloroformo
1 ml	Alcohol isoamílico

Se vacían en un recipiente 24 ml de cloroformo y se agrega 1 ml de alcohol isoamílico. Se envuelve con papel aluminio si no se dispone de un contenedor ámbar y se almacena a temperatura ambiente.

Molecular Evaluation of the Prevalence of Oncogenic Human Papillomavirus Genotypes in Cervical Acetowhite Lesions

Leticia Rocha-Zavaleta^a Alejandro Garcia-Carranca^{a,b}
Angeles Lira de la Cruz^a Tonatiuh Barrios^a Victor Valdespino^c
Fernando Cruz-Talonia^d

^aDepartment of Molecular Biology and Biotechnology, Institute of Biomedical Research, National University of Mexico, ^bResearch Division, National Cancerology Institute, ^cOncology Hospital, National Medical Centre XXI Century, ^dNational Centre for Clinics of Dysplasias, General Hospital of Mexico, Mexico, Mexico

Key Words

Human papillomavirus · Acetowhitening · Cervical screening · Hybrid capture test · Oncogenic HPV genotypes

Abstract

The actual prevalence of cancer-related human papillomavirus (HPV) genotypes in cervical acetowhite lesions has not been established. In this work, the presence of oncogenic types of HPV in cervical acetowhite tissue was evaluated by molecular means. The presence of HPV DNA was determined in a group of women with and without cervical acetowhite lesions by a polymerase chain reaction (PCR) using the MY09/MY11 primers. The presence of 13 oncogenic HPV types was evaluated using the Hybrid Capture II test, and the prevalence of HPV type 16 (HPV16) was studied using an HPV16-specific PCR. HPV DNA was detected in 85.9% patients with acetowhite lesions; oncogenic HPV types were found in 83.7% of them; HPV16 was identified in 51.1% of the cases. HPV DNA was detected in 87.3% of the patients without acetowhite changes. Interestingly only 16.8% were infected by oncogenic genotypes and 2.5% were

positive for the presence of HPV16. In conclusion, sub-clinical infection by oncogenic HPV genotypes is associated with the presence of acetowhite cervical tissue ($p < 0.0005$). Therefore, women showing acetowhite lesions might be at risk of developing cervical cancer.

Copyright © 2002 S. Karger AG, Basel

Infection by genital human papillomavirus (HPV) is a common sexually transmitted disease. HPV genotypes 6 and 11 produce benign genital warts (condyloma acuminata) and have been termed 'low-risk'. In contrast, genotypes 16, 18 and related types have been termed 'high-risk' or oncogenic types because of their association with cervical tumours [1]. In fact, infection by high-risk HPV types is the main risk factor for progression to cervical cancer [2]. Thus, detection and treatment of high-risk HPV-associated lesions would help preventing women from developing malignant tumours.

Acetowhitening of cervical tissue, after the application of acetic acid, has been used as a tool for the diagnosis of HPV infections by visual methods, such as cervicocopy and colposcopy. Acetic acid reacts with abnormal epithelium, presumably infected by a viral agent, producing the

Table 1. Evaluation of additional risk factors, related with the development of cervical cancer, in women with and without cervical acetowhite lesions

	Patients with acetowhite lesions (n = 135)	Patients without acetowhite lesions (n = 119)
Age, years	32.6	31.5
Age at first intercourse, years	18	19.7
Number of pregnancies	3	2.8
Number of sexual partners	1.5	1.4

Data represent the mean value of the population studied.

whitening of the tissue (acetowhite lesions). In developing countries, where cervical cancer is still a major cause of death and screening programmes have serious technical problems [3], cervicospscopy [4] and colposcopy are being investigated as alternative screening methods; however, their clinical value remains uncertain since the actual prevalence of HPV, and in particular of high-risk HPV genotypes in cervical acetowhite tissue, has not been determined. To improve the detection of HPV in clinical samples, molecular techniques like the polymerase chain reaction (PCR) and the Hybrid Capture II test have been developed; these methods allow the sensitive detection of specific HPV genotypes [5, 6]. The present project aimed to determine the prevalence of oncogenic HPV genotypes in samples from cervical acetowhite lesions, in particular HPV16, using PCR and the Hybrid Capture test.

Patients attending the National Centre of Clinics of Dysplasias (CENACLID) at the General Hospital of Mexico, Mexico City, were studied. Patients without a previous Pap smear who consented to participate in the study underwent colposcopy. Acetowhite changes of the cervix were recorded 30–60 s after the application of a 15% acetic acid solution. Cases with condylomas and advanced cancer were excluded because of their already known association with certain HPV types. DNA was extracted [7] from colposcopy-directed biopsies. PCR amplification of a broad spectrum of HPV types was achieved by using the universal, degenerate primers MY09 and MY11 [8]. Specific amplification of HPV16 was achieved by using the Pr3 and Pr4 primers [3]. The Digene HPV Test Hybrid Capture® II (Digene Corp., Beltsville, Md., USA) for the detection of high-risk HPV types 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68 was used according to the manufacturer's instructions. The χ^2 test was used to iden-

tify statistical associations; a p value <0.05 was considered statistically significant. Sensitivity, specificity, efficiency, positive and negative predictive values, and 95% confidence intervals were calculated using standard formulas.

254 patients participated in this study. 135 patients presenting acetowhite lesions were included in the case group and 119 women without evidence of acetowhite changes were included in the control group. Data related with additional risk factors for cervical cancer are presented in table 1.

In the case group, the presence of HPV DNA was confirmed in 116/135 (85.9%) patients. On the other hand, viral DNA was detected in 104/119 (87.3%) women in the control group. Statistical analysis showed that the prevalence of HPV in cases and controls was not significantly different ($p = 0.874$). Our data are in agreement with those of other authors who have also reported a high prevalence of HPV infections in women attending gynaecologic clinics in different countries [9–11]. Our observations seem to indicate that the virus is present in women whose cervixes seem normal on colposcopy. A reasonable explanation for this observation would be the presence of a latent infection. It is known that latent HPV infections are very common, do not depend on HPV type and can only be detected by the presence of HPV DNA since they do not produce any macroscopic or histologic abnormality [12]. These results suggest that acetowhitening is not a good indicator of the presence of HPV infections (table 2). Our observation is in agreement with a previous report in which colposcopy was compared with PCR and was demonstrated to be a poor predictor of HPV infections [13].

Hybrid Capture analysis revealed the presence of oncogenic HPV types in 113/135 (83.7%) cases and only 20/119 (16.8%) control samples. Moreover, 69 (51.1%) cases were positive for the presence of HPV16, compared with only 3 (2.5%) controls. These results suggest that cervical acetowhite lesions are mainly caused by infection with oncogenic HPV genotypes. This observation might have important clinical implications. The presence of high-risk HPV in abnormal cervical tissue is the main risk factor for the progression to cervical intraepithelial neoplasia (CIN) [14], carcinoma in situ [15], and eventually to invasive carcinoma [2]. In the absence of HPV DNA or in the presence of low-risk HPV types, progression seems unlikely [14]. Here we showed that high-risk viruses are present in more than 80% of patients exhibiting acetowhite lesions; these women are therefore at an increased risk of progression to more advanced lesions and should be managed carefully.

Table 2. Sensitivity, specificity, predictive value and efficiency of acetowhitening as a predictor of HPV infection in 254 women

	Detection of general HPV infections ^a	Detection of infections by high-risk HPV genotypes ^b
True positive	116	113
False positive	19	22
True negative	15	99
False negative	104	20
Sensitivity (95% CI)	52.7% (45.9–59.4)	84.9% (77.7–90.5)
Specificity (95% CI)	44.1% (27.1–62.1)	81.8% (73.7–88.2)
Positive predictive value (95% CI)	85.9% (78.9–91.3)	83.7% (76.3–89.5)
Negative predictive value (95% CI)	12.6% (7.2–19.9)	83.1% (75.2–89.4)
Efficiency of test result (95% CI)	51.5% (45.2–57.8)	83.4% (78.3–87.8)

CI = Confidence interval.

^a 'General HPV infection' means infection by any genital HPV genotype.

^b Infection by the 13 high-risk HPV genotypes detected by the Digene HPV Test Hybrid Capture® II.

The clinical usefulness of the detection of HPV in women has been previously evaluated; in fact, it has been established that high-risk HPV testing in women with an abnormal Pap smear has a high negative predictive value, therefore high-risk HPV negativity might be a predictor of the absence of important cervical lesions [16]. Nevertheless, an association of high-risk HPV with acetowhitening of the cervix had not been established. Here we found that acetowhitening correlates with the presence of high-risk HPV genotypes ($p < 0.0005$), suggesting that it may be a rather specific and sensitive method for the detection of such genotypes (table 2). Interestingly, in a former work, Baldauf et al. [17] found that patients with a negative colposcopy had a significantly smaller probability of progression to CIN. Our work indicates that most women without acetowhite changes who are negative for the presence of high-risk HPV have a small probability of progression, which is somehow in agreement with the observations of Baldauf et al.

The mechanism causing the acetowhitening of the epithelium is not yet clear; it has been associated with a sexually transmitted agent [13], very likely a virus, that produces an increasing expression of proteins, such as cytokeratin 10 [18], and areas of high nuclear density. Our observations seem to suggest that high-risk HPV types might induce changes in the infected cells that produce a reaction with acetic acid. In this respect it is known that oncogenic HPV types have the capacity of transforming the host cells. Experimental evidence suggests that cells infected by oncogenic HPV types undergo important molecular and genetic changes from early stages of infection [19, 20]. Further studies will be needed to investigate

whether some of these changes are related with the capacity of cells to react with acetic acid.

In conclusion, the results presented here show that acetowhitening of cervical epithelium is correlated with sub-clinical infections by oncogenic types of HPV. As a consequence, patients presenting acetowhite cervical lesions might be at an increased risk of developing cervical cancer. To reinforce these observations, follow-up studies with larger populations will be performed.

Acknowledgements

We thank Miriam C. Guido, BSc, for technical assistance and Dr. Jorge Ortiz L., Dr. Guillermo Gomez G. and Dr. Miguel A. Castillo E. for their participation in the collection of samples.

References

- Walboomers JMM, Jacobs MV, Manos: Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
- Saito J, Fukuda T, Hoshiaki H, Noda K: High-risk types of human papillomavirus associated with the progression of cervical dysplasia to carcinoma. *J Obstet Gynaecol Res* 1999;25:281-286.
- Lazcano-Ponce EC, Moss S, Alonso P, Salmeron J, Hernandez M: Cervical cancer screening in developing countries: Why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch Med Res* 1999;30:240-250.
- Chirenje ZM, Chipato T, Kasule J, Ngwale E, Rusakaniko S, Makunike R, Gaffikin L, Blumenthal P, McGrath J: Visual inspection with acetic acid for cervical cancer screening: Test qualities in a primary care setting. *Lancet* 1999;353:869-873.
- Karlsen F, Kalantari M, Jenkins A, Pettersen E, Kristensen G, Holm R, Johansson B, Haggmar B: Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol* 1996;34:2095-2100.
- Riethmuller D, Gay C, Bertrand X, Bettinger D, Schaal JP, Carbillet JP, Lassabe C, Aryeux P, Seilles E, Mouglin C: Genital human papillomavirus infection among women recruited for routine cervical cancer screening or for colposcopy determined by hybrid capture II and polymerase chain reaction. *Diagn Mol Pathol* 1999;8:157-164.
- Kaye JN, Cason J, Pakarian FB, Jewers RJ, Kell B, Bible J, Raju KS, Best JM: Viral load as a determinant for transmission of human papillomavirus type 16 from mother to child. *J Med Virol* 1994;44:415-421.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM: Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209-214.
- Strauss S, Jordens JZ, McBride D, Sonnex C, Edwards S, Desselberger U, Watt P, Gray JJ: Detection and typing of human papillomavirus DNA in paired urine and cervical scrapes. *Eur J Epidemiol* 1999;15:537-543.
- Tonon SA, Picconi MA, Zinovich JB: Human papillomavirus cervical infection and associated risk factors in a region of Argentina with a high incidence of cervical carcinoma. *Infect Dis Obstet Gynecol* 1999;7:237-243.
- Feoli-Fonseca JC, Oligny LL, Brochu P, Simard P, Falconi S, Yotov WV: Human papillomavirus (HPV) study of 691 pathological specimens from Quebec by PCR-direct sequencing approach. *J Med Virol* 2001;63:284-292.
- Handsfield HH: Clinical presentation and natural course of anogenital warts. *Am J Med* 1997;102:16-20.
- Jonsson M, Karlsson R, Evander M, Gustavsson A, Rylander E, Wadell G: Acetowhitening of the cervix and vulva as a predictor of subclinical human papillomavirus infection: Sensitivity and specificity in a population-based study. *Obstet Gynecol* 1997;90:744-747.
- Remmink AJ, Walboomers JM, Helmerhorst TJ, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Risse EK, Meijer CJ, Kenemans P: The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease: Natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995;61:306-311.
- Ylitalo N, Josefsson A, Melbye M, Sorensen P, Frisch M, Andersen PK, Sørensen P, Gustafsson M, Magnusson P, Ponten J, Gyllensten U, Adami HO: A prospective study showing long-term infection with human papillomavirus 16 before the development of cervical carcinoma in situ. *Cancer Res* 2000;60:6027-6032.
- Infantino C, Fabris P, Infantolino D, Biasin MR, Venza E, Tositti G, Minucci D: Usefulness of human papillomavirus testing in the screening of cervical cancer precursor lesions: A retrospective study in 314 cases. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;93:71-75.
- Baldauf JJ, Cuenin C, Ritter J: Long-term progress of low-grade intraepithelial lesions after a smear and colposcopy, directed biopsies and/or normal endocervical curettage. *Contracept Fertil Sex* 1999;27:774-779.
- Maddox P, Szarewski A, Dyson J, Cuzick J: Cytokeratin expression and acetowhite change in cervical epithelium. *J Clin Pathol* 1994;47:15-17.
- Southern SA, Herrington CS: Differential cell cycle regulation by low- and high-risk human papillomaviruses in low-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Cancer Res* 1998;58:2941-2945.
- Cottage A, Downen S, Roberts I, Pett M, Coleman N, Stanley M: Early genetic events in HPV immortalised keratinocytes. *Gen Chrom Cancer* 2001;30:72-79.