

11262



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y
NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"

EFFECTO DEL GEN E6 DEL VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO 18 (VPH) Y HORMONAS
ESTEROIDEAS SOBRE EL FACTOR DE
CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR
(VEGF) EN LA LINEA CELULAR MCF7

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS
P R E S E N T A
DR. DAVID F. CANTU DE LEON

Francisco

TUTOR: DR. ALFONSO DUEÑAS GONZALEZ
CO-TUTOR: DRA. MARCELA LIZANO SOBERON

MEXICO, D. F. AGOSTO [REDACTED]

0352036

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

INDICE

MARCO TEORICO	2
Definición del Problema	2
Definición y Características Generales de los Factores de Crecimiento Celular	2
Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)	5
Virus del Papiloma Humano	7
Variantes del VPH	9
Cáncer de Cérvix y Angiogénesis	10
Interacción Hormonal	12
JUSTIFICACION	15
HIPOTESIS	16
Hipótesis Nula	16
Hipótesis Alterna	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
MATERIAL Y METODOS	17
Células y Condiciones de Cultivo	17
Transfección	17
Aplicación de Drogas	18
Elisa para VEGF	19
Descripción del Ensayo	19
Principios del Ensayo	19
Limitaciones del Procedimiento	20
Reactivos que Incluye	20
Precauciones	21
Recolección y Almacenamiento de las Muestras	21
Preparación de los Reactivos	21
Realización del Ensayo	22
Cálculo de Resultados	24
Sensibilidad del Ensayo	24
Especificidad del Ensayo	24
Calibración	24
Análisis de Datos	25
RESULTADOS	26
Expresión de VEGF en las Líneas Celulares Controles	27
Influencia del Estradiol en la Expresión de VEGF	29
Influencia de la Progesterona en la Expresión de VEGF	31
Influencia del ICI-182.780 en la Expresión de VEGF	34
Influencia del RU-486 en la Expresión de VEGF	36
DICUSION	38
CONCLUSIONES	45
BIBLIOGRAFIA	46

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo reseccional.

NOMBRE: _____

FECHA: _____

FIRMA: _____

TITULO: EFECTO DEL GEN E6 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO 18 (VPH) Y HORMONAS ESTEROIDEAS SOBRE EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR (VEGF) EN LA LINEA CELULAR MCF 7

MARCO TEORICO

DEFINICION DEL PROBLEMA

La angiogénesis es un mecanismo importante en el crecimiento tumoral que puede ser afectado por hormonas esteroideas (Estrógenos y Progesterona), al mismo tiempo es posible que dependa de la variante de E6 del VPH con la que puede estar infectada la célula.

ANTECEDENTES

Definición y características generales de los factores de crecimiento celular

Los factores de crecimiento (Growth Factor ó GF) son moléculas polipeptídicas producidas en los diferentes órganos y que de acuerdo a su función fisiológica se dividen en tres grupos (*Ganong, 1992*):

- * Factores que favorecen la multiplicación, diferenciación ó el desarrollo de diferentes tipos celulares, como el factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).

- * Factores producidos por macrófagos y linfocitos que intervienen en el sistema inmune, conocidos como citocinas.

- * Factores estimulantes de colonias que regulan la maduración de eritrocitos, leucocitos y plaquetas.

Los diferentes estudios in vitro han permitido conocer las funciones de algunos factores de crecimiento en tipos de células específicas, sin embargo, el comportamiento en modelos in vivo resulta ser diferente. Un solo GF puede producir respuestas distintas,

además de estimular el crecimiento celular, tal es el caso de algunos GF, que fortalecen la supervivencia celular, favorecen la migración celular y estimulan la secreción hormonal (*Ganong, 1992; Watson, 1994*).

Es conocido que algunos de los efectos de la unión de los GF a su receptor de membrana son inmediatos, tales como: cambios iónicos, fosforilación de proteínas y cambios metabólicos en la membrana fosfolipídica. Otros efectos mediatos implican la inducción de la transcripción de algunos genes y la expresión de proteínas (*Watson, 1994*).

Crecimiento inicial de las neoplasias

La proliferación y la supervivencia celular son dependientes de un adecuado suministro de factores de crecimiento y la eliminación de moléculas tóxicas. En los tejidos sólidos, por ejemplo, el oxígeno, puede difundirse en forma radial a partir de capilares de 150 a 200 μm , cuando la distancia es mayor la célula muere. Por lo tanto la expansión tumoral depende de un adecuado flujo sanguíneo (*Warren, 1966; De Vita, 1997*).

La neovascularización asociada al tumor promueve el rápido crecimiento del mismo aumentando así el riesgo de metástasis. Se define angiogénesis como la producción de nuevos capilares y vénulas en una área específica (*Weidner, 1991; Wiggins, 1995*). La hipótesis que el crecimiento tumoral depende de la inducción de neovascularización, se originó en la década de los sesenta; en nuestros días esta teoría se encuentra totalmente demostrada. Datos experimentales y clínicos indican que la mayoría de los tumores se originan sin actividad angiogénica existiendo en el estadio in situ sin neovascularización por un largo período de tiempo (meses hasta años), posteriormente se induce la neovascularización cuando un subgrupo de células intratumorales adquieren el fenotipo angiogénico (*Folkman, 1990; Dellas, 1997*). Estos cambios fenotípicos pueden ocurrir desde estadios preinvasores o pre-neoplásicos (*Dellas, 1997*).

En el melanoma cutáneo, cáncer de mama, vejiga y próstata la cantidad de angiogénesis tumoral se relaciona con pronóstico sugiriendo que las propiedades angiogénicas se correlacionan con la agresividad de la clona tumoral (Srivastava,1998).

Dos tipos de eventos son necesarios para que un tumor pequeño sea capaz de iniciar angiogénesis (Okada, 1998).

Primero: Ganancia de función. En este evento, ciertos factores estimulantes del crecimiento son inducidos o sobre-expresados en las células tumorales. Dentro de ellos se encuentran el VEGF, bFGF, TGF- β , y TGF- α , entre otros.

Segundo: Pérdida de la función, de varios inhibidores de la angiogénesis, tales como trombospondina o interferones α/β .

La angiogénesis tumoral puede ser inducida o regulada, por lo menos en parte, por los mismos cambios genéticos que causan el cáncer, posiblemente actuando en conjunto con ciertas influencias ambientales tales como la hipoxia (Okada, 1998).

La angiogénesis es mediada por múltiples moléculas que pueden ser liberadas tanto por el tumor como por las células del huésped, incluyendo células endoteliales, células epiteliales, células mesoteliales y leucocitos. Dentro de estas se encuentran los miembros de la familia de los factores de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), también llamado factor de permeabilidad vascular (VPF), interleucina-8 (IL-8), angiogenina, angiotropina, factor de crecimiento epidérmico (EGF), fibrina, nicotinamida, factor de crecimiento de células endoteliales derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformantes - α (TGF- α), TGF- β , y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (De Vita, 1997).

El grado de angiogénesis es determinado mediante el balance en los factores que estimulan y aquellos que inhiben el crecimiento de los nuevos vasos sanguíneos. En muchos de los tejidos normales la influencia inhibitoria predomina. Por el contrario, muchas de las células neoplásicas cambian de un fenotipo inhibidor de angiogénesis hacia uno estimulante de la misma, como se ha observado en cultivos de fibroblastos de pacientes con síndrome de Li-Fraumeni. El cambio hacia el fenotipo angiogénico coincide con la pérdida del alelo del tipo silvestre de p53 (wt p53). Datos recientes han mostrado que p53 puede regular la actividad promotora del gen bFGF a nivel transcripcional ya que la expresión de bFGF se activa por p53 mutada. El tipo silvestre de p53 reprime la expresión de bFGF y su mutante la activa, lo cual sugiere que p53 puede jugar un papel en el cambio angiogénico (*Warren, 1966*).

FACTOR DE CRECIMIENTO VASCULAR ENDOTELIAL (VEGF)

Se trata de una glucoproteína dimérica de 34 a 45 KD, presenta una pequeña homología secuencial con el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y una homología mas cercana con el Factor de crecimiento Placentario.

Se conocen cuatro diferentes transcritos que codifican polipéptidos de 206, 189, 165 y 121 amino-ácidos expresados por las células humanas (*Dvorak, 1995*). La secuencia de 165 aa es la más frecuentemente expresada, sin embargo las diferentes isoformas aparentemente expresan la misma actividad biológica.

La acción directa del VEGF es sobre las células endoteliales mediante tres receptores trans-membrana Clase III de la Tirosinacinas, que se expresan predominantemente en el endotelio vascular (*Dvorak, 1995; Hanahan, 1996*) aumentando la función de un organelo descrito recientemente, conocido como Organelo Vesicular-Vacuolar. VGF se expresa tanto a nivel de mRNA como de Proteína en un gran número de tumores tanto animales como humanos (*Dvorak, 1995*).

En ratones y células epiteliales colónicas, la transformación mediante el oncogén ras activado ha mostrado que estimula la expresión de VEGF. Debido a que el promotor VEGF/VPF contiene cuatro sitios potenciales AP1 que son componentes importantes en el patrón de señal de ras; así ras mutado puede sobre-expresar la actividad angiogénica mediante una vía directa de control transcripcional de VEGF. En forma global, estos datos muestran que la transformación mediante un oncogén contribuye a la tumorigenicidad in vivo mediante sobre-expresión de la actividad del factor/receptor de crecimiento y mediante sobre-expresión de las moléculas angiogénicas (*Rak, 2000*).

Se ha observado que oncogenes como HER-2/neu mutado, sobre-expresión de HER-2/neu normal y sobre-expresión de receptores de EGF pueden inducir o sobre-expresar VEGF de manera similar que ras mutado. El tratamiento de células tumorales blanco humanas con anticuerpos monoclonales contra el receptor de EGF o de HER-2/neu puede resultar en la disminución de la expresión de VEGF, tanto in vivo como in vitro (*Okada, 1998*).

Se han detectado valores elevados de VEGF en diversos fluidos, tales como líquido de derrame pleural, ascitis y suero de pacientes con cáncer (*Moon, 2000*) y pudiera ser un marcador sérico tanto diagnóstico como predictor de respuesta al tratamiento. En el estudio de Moon et al, se observaron valores séricos estadísticamente mas elevados entre pacientes normales y aquellas con cáncer cervico-uterino, los cuales disminuyeron a la normalidad cuando recibieron tratamiento oncológico, no pudiéndose determinar exactamente el origen del mismo en el suero. Además, estos valores fueron mucho mas elevados en pacientes con estadios localmente avanzados en comparación con los estadios tempranos de la enfermedad (*Moon, 2000*).

En el estudio de Berse et al, se encontró que los tumores que producen elevados niveles de VEGF se diseminan mas efectivamente debido a una mayor permeabilidad vascular, indicando los valores mas altos sospecha de enfermedad metastásica a distancia (*Berse, 1992*).

El balance entre los factores angiogénicos y los inhibidores del proceso son los que gobiernan el *switch* de la angiogénesis haciendo tanto al VEGF como al proceso de angiogénesis, un blanco terapéutico atractivo en el manejo de los pacientes con neoplasias malignas (*Ferrara, 2004*).

VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

Es un pequeño virus DNA cuyas partículas de forma icosaédrica miden aproximadamente 54 nm de diámetro. El genoma viral está constituido aproximadamente por 8000 nucleótidos en forma de DNA de doble cadena cerrada. En relación a su genoma, se clasifican en más de 100 tipos, tanto animales como humanos (*DiMaio, 1991*).

Este virus se ha asociado al cáncer cervico-uterino debido a que cerca del 100% de tumores epidermoides del cérvix contienen DNA del virus en el genoma de las células tumorales (*Turek, 1996; DeVita, 1997*).

El genoma viral puede ser dividido en tres regiones (*DiMaio, 1991*):

- * Una región reguladora o LCR o URR, las cuales contienen las secuencias para la replicación y expresión de los genes del virus.

- * La región génica viral temprana, que compromete prácticamente la mitad del genoma viral. Los genes tempranos son E1 y E2, que se encargan de la replicación y el control transcripcional; E6 y E7, responsables de la alteración del crecimiento de las células infectadas y actual por lo menos en parte con el control de transcripción de las células huésped y en el ciclo celular de las mismas, y E5 modulando la división celular desde la membrana celular.

- * La región tardía, que consiste en los genes L1 y L2, los cuales codifican las proteínas de la cápside viral.

Los genes E6 y E7 del VPH codifican dos pequeños polipéptidos que representan las proteínas transformadoras virales; esto es, las proteínas necesarias para el establecimiento y el mantenimiento de la inmortalización, así como otras propiedades de crecimiento características de las células tumorales (*DiMaio, 1991*).

Las oncoproteínas E6 y E7 invariablemente se encuentran preservadas y expresadas en las líneas celulares de cáncer cervical así como en los tumores (*Turek, 1996*).

Estas proteínas interfieren con la función de los productos de los genes supresores de tumor. Las proteínas de E7 forman complejos con el producto del gen del retinoblastoma ó Rb y las proteínas relacionadas, p107 y p130. Existe la hipótesis que la ruptura del complejo pRB-E2 por la proteína E7 y la consecuente liberación de factor de transcripción de E2 es un evento crítico para la desregulación del crecimiento y las propiedades transformadoras de la oncoproteína viral E7 (*Pagano, 1992*).

La proteína E6 interactúa con la proteína p53, la cual se encuentra mutada en muchas neoplasias humanas (*Nevins, 1991; Turek, 1996*). La proteína E6, al unirse e inactivar a p53 por incrementar su degradación, interfiere en forma importante al prevenir la apoptosis o muerte celular programada lo cual lleva a la activación de la telomerasa, un complejo de ribonucleoproteína responsable para la síntesis de las secuencias repetidas del telómero, lo cual se encuentra ligado a la inmortalización celular y es característica en la mayoría de los tumores (*Klingelutz, 1996*).

En resumen, las oncoproteínas virales E6 y E7 comparten una forma importante de acción: Ambas activan un grupo importante de genes celulares que codifican enzimas y proteínas reguladoras implicadas en la progresión del ciclo celular (*Turek, 1996*). Ambas proteínas de los tipos de VPH asociados al cáncer, tipos 16 y 18, son más efectivas para llevar a cabo estas interacciones que aquellas de los tipos 6 y 11 que se asocian en mayor medida a lesiones benignas (*Turek, 1996*).

La expresión de las oncoproteínas del virus del papiloma humano (VPH) es necesaria para iniciar la transformación maligna, así como para mantener el fenotipo maligno en células de cáncer cervical totalmente transformadas (*Von Knebel Doeberitz, 1994*).

La caracterización de las propiedades de crecimiento de estas células indica que el fenotipo neoplásico está claramente ligado a la expresión continua de los genes virales E6-E7 (*Von Knebel Doeberitz, 1994*). La expresión de los genes virales se encuentra alterada en el carcinoma del cérvix uterino y estos desarreglos representan pasos importantes en la carcinogénesis y progresión tumoral (*Turek, 1996*).

VARIANTES DE VPH

Es bien sabido que existen varias ramas filogenéticas derivadas del VPH, específicamente del 16: Europea, Asiática, Asiática-Americana, Africana 1 y Africana 2. Esta diversidad viral más que encontrarse asociada a la ubicación geográfica, se relaciona con las características étnicas de la población (*Villa, 2000*).

Se define como variantes moleculares, cuando la diferencia en la secuencia de nucleótidos es menor del 2% en las regiones codificadoras y el 5% en las regiones no codificadoras del genoma viral con respecto al prototipo de esa cepa (*Bernard, 1994; Villa, 2000*). Las bajas tasas de evolución del VPH hacen pensar que ha co-evolucionado con su huésped natural por un período de varios millones de años. Las pocas diferencias en los nucleótidos de las variantes del VPH corresponden a cambios en aminoácidos y esto puede hacer que haya cambios en las propiedades funcionales y antigénicas de proteínas virales específicas, por ejemplo, la variante 114K del VPH 16 se introduce a partículas parecidas a las virales (*virus-like*) en un sistema de expresión heteróloga mientras que la referencia, esto es el prototipo de VPH 16, no tiene la misma propiedad.

Esto es atribuible al cambio único de un aminoácido en el residuo 202 (Asp a His) del gen L1 otros cambios en L1 o L2 de las diferentes variantes puede ser relevante en el diseño de vacunas (*Villa, 2000*). También se ha reportado que variaciones específicas de

VPH 16 puedan interferir con la respuesta inmune de las células T citotóxicas (*Ellis, 1995; Villa, 2000*).

La policlonalidad de las lesiones y la frecuencia particular de las variantes del VPH, pueden ser de importancia en el entendimiento de la patogenicidad y las características de los patrones de infección (*Villa, 2000*). Las variaciones intratípicas del VPH han mostrado ser un importante predictor en la progresión de las lesiones cervicales así como es de utilidad para estudios en los que se quiera determinar los patrones de transmisión y persistencia del virus (*Franco, 1994; Xi, 1995; Villa, 2000*).

Estas variantes del VPH han sido determinadas en diferentes países, en nuestro país se han podido determinar variantes de los serotipos 16, 18 y 45 (*Lizano, 1996*), encontrándose variaciones tanto en la secuencia de nucleótidos como en aminoácidos resultantes. Se encontró además, que algunas de éstas variantes se encuentran en ciertas estirpes histológicas específicas, lo cual hace pensar que cada una de las variantes pudiera tener un comportamiento biológico diferente en comparación con el virus prototipo (*Lizano, 1996*).

CANCER DE CERVIX Y ANGIOGENESIS

El cáncer cervical es uno de los tumores malignos más comunes, ocupando la segunda causa de muerte por cáncer en mujeres a nivel mundial (*DeVita, 1997*). En México es la principal muerte por cáncer de la población femenina en edad reproductiva (*RHNM, 2002*).

La radioterapia y la cirugía (Histerectomía radical con linfadenectomía pélvica bilateral) son los pilares fundamentales del tratamiento del carcinoma cervico-uterino y la elección del mismo depende de una serie de factores entre los que se incluyen el estadio clínico, tamaño del tumor, tipo histológico, la presencia de contraindicaciones médicas para radioterapia o cirugía y la preferencia de la paciente en ciertos casos (*DiSaia, 1999*).

En general, el cáncer microinvasor (IA1) se puede tratar conservadoramente mediante conización o histerectomía extrafacial y los tumores tempranos (IA2, IB1 y algunos IIA pequeños) se pueden manejar ya sea con radioterapia o con cirugía radical (histerectomía radical y linfadenectomía pélvica bilateral). En los tumores localmente avanzados (IB2 a IVA) la radioterapia en combinación con quimioterapia concomitante es la modalidad terapéutica más importante (*Duenas-Gonzalez et al. 2003*).

El carcinoma cervical se origina en la unión escamo-columnar ya sea en el canal endocervical o en la porción cérvico-uterina. La lesión precursora es displasia o carcinoma in situ (neoplasia intraepitelial cervical -NIC-) que posteriormente puede convertirse en cáncer invasor. Este proceso puede ser muy lento y se ha observado que puede tomar desde 1 a 12 años (*DeVita, 1997*).

En general, el cáncer cervical progresa de manera ordenada. La extensión del tumor cervical puede manifestarse como una ulceración, un tumor exofítico o la infiltración extensa del tejido subyacente incluyendo la vejiga o el recto, además puede diseminarse por vía de los canales linfáticos regionales o del torrente sanguíneo. La diseminación tumoral generalmente es una función de la extensión e invasión de la lesión local en el estroma del cérvix (*DiSaia, 1999*).

La primera demostración en el cambio al fenotipo angiogénico ha sido informada recientemente en lesiones pre-invasoras del cérvix uterino (*Dellas, 1997; DiSaia 1999*), evaluándose la cantidad de vasos mediante tinciones de inmunohistoquímica, conforme la lesión progresa hacia un grado mayor la cantidad de microvasos aumenta, lo cual refleja la expresión de algunos factores de crecimiento expresados por las células displásicas (*Smith-McCune, 1994; Dellas, 1997; Dobbs, 1997*). Autores como Satfl, Mattingly y Abulafia, han sugerido que la neovascularización se observa en aquellos casos de carcinoma in situ que progresan a enfermedad invasora (*Stafl, 1975; Abulafia, 1996*).

En tumores invasores el incremento en la microvasculatura tumoral se ha asociado con un período libre de enfermedad menor (*Chodak, 1980, Wakui, 1992, Folkman, 1995; Srivastava, 1998; Horak, 1992*), sugiriendo que las propiedades angiogénicas se correlacionan con la agresividad de la clona tumoral (*Folkman, 1995*). Lo anterior ha sido informado por múltiples autores (*Schlenger, 1995; Dellas, 1997; Obermair, 1998*), observándose también en un grupo de pacientes en el Instituto Nacional de Cancerología de México, en las cuales se asoció el aumento de la densidad microvascular y la edad con una mayor tasa de recurrencia y un período de supervivencia más corto en aquellas pacientes menores de 40 años con estadios clínico IIB y con densidad microvascular mayor de 20 (*Cantu de Leon, 2003*).

INTERACCION HORMONAL

De las hormonas esteroideas, el estradiol es importante tanto en hombres como en mujeres para una gran variedad de procesos fisiológicos. Los estrógenos afectan el crecimiento, diferenciación y función de tejidos del sistema reproductor, incluyendo glándula mamaria, útero, vagina y ovarios en las mujeres, mientras que en los hombres, interviene en la función testicular, prostática y del epidídimo. Juega papel importante en el mantenimiento de la densidad ósea y protege contra la osteoporosis, asimismo se ha considerado un efecto protector del corazón, esto debido a sus efectos en los lípidos sanguíneos. Por otro lado, hay evidencia tanto clínica como experimental que sugiere a los estrógenos como un factor dominante en la iniciación o progresión de tumores como el cáncer de mama (*Hyder, 2001*).

En ratas se ha observado que el estradiol regula el crecimiento de tumores mamarios inducidos por 7,12-dimetilbenza-antraceno. Esta regulación representa un cambio transcripcional directo (*Nakamura, 1996; Hyder, 1998*).

El conocimiento de la regulación angiogénica puede dar una mayor visión para entender los mecanismos responsables para el crecimiento tumoral y las metástasis, tratamientos farmacológicos y medidas que puedan disminuir la incidencia tumoral. Se ha reportado que las hormonas esteroideas controlan la expresión de VEGF. Específicamente se ha observado que los estrógenos regulan la expresión de VEGF en el útero, siendo importante la estimulación para reparar y regenerar el endometrio posterior a la menstruación y en situaciones patológicas como el crecimiento de los tumores (*Hyder, 1998; Hyder, 2001*).

Hay estudios epidemiológicos que muestran un mayor riesgo en neoplasia cervical en pacientes que utilizan anticonceptivos orales. Los cambios hormonales también juegan un papel en el incremento en la prevalencia de la infección por VPH del tracto genital inferior de las mujeres durante el embarazo. El mecanismo de la activación de la infección y de la oncogénesis puede involucrar la presencia y expresión de elementos que responden a glucocorticoides de la región no codificadora del VPH, específicamente del subtipo 16 (*Pater, 1990; Lacey, 2000*).

Se conoce claramente que los progestágenos incrementan la expresión de VEGF en el útero tanto de humanos como de roedores. Asimismo, esto puede ser bloqueado por el anti-progestágeno RU486 sugiriendo que esto puede ser mediado por el sistema clásico de los receptores de progesterona a nivel transcripcional. De igual manera, disminuye la respuesta hormonal de los elementos de respuesta a glucocorticoides y de los elementos de respuesta a progesterona del VPH. Aunque el mecanismo bioquímico específico por el cual los progestágenos elevan el VEGF requiere ser descrito en su totalidad. Los niveles plasmáticos en valores nanomolares que estimulan un gen para la expresión de VEGF se alcanzan fácilmente después de la ingestión de anticonceptivos orales que contengan noretindrona y norgestrel así como en el pico máximo que se alcanza en la fase lútea del ciclo menstrual lo cual sugiere la posibilidad que la exposición a progestágenos de cualquier fuente ya sea farmacológica, fisiológica o ambiental pueda jugar un papel en el desarrollo de neoplasias aumentando los niveles de un factor angiogénico (*Hyder, 1998*).

Sin embargo, la regulación de la expresión de éste factor es complejo y tiene especificidad para especie, hormona y característica celular. Los progestágenos, aun cuando incrementan la angiogénesis regulada por VEGF, lo cual favorece las metástasis; al mismo tiempo disminuyen la proliferación celular por un mecanismo diferente, esto es de particular importancia ya que se ha descrito un incremento en la expresión de moléculas de adhesión, tales como la beta-1-integrina lo cual tiene un papel importante en las metástasis facilitando el tránsito de células tumorales a través de la membrana basal facilitando su entrada a la circulación (*Hyder, 1998; Hyder, 2001*).

ICI-182,780 es un compuesto que es catalogado dentro del grupo de los moduladores de receptores estrogénicos selectivos (SERMs) con una función anti-estrogénica pura que bloquea la transcripción proveniente de los dominios AF-1 y AF-2, así como induce degradación del receptor estrogénico lo cual lleva a una reducción importante en la concentración celular de estrógenos (*Fawell, 1990; Osborne, 2000*). Esta droga ha demostrado actividad antitumoral en modelos preclínicos, tal es el caso de líneas celulares resistentes a tamoxifén que pueden ser sensibles a la inhibición por ICI-182,780 (*Wakeling, 1993; Osborne, 2000*). Cuando las células MCF-7 son crecidas en un modelo de ratón atímico, ICI-182,780 demuestra una inhibición importante en la tumorigénesis así como en la regresión tumoral, de igual manera cuando los tumores en éstos modelos desarrollan resistencia al tamoxifén, la inhibición por ICI-182,780 continua siendo importante (*Osborne, 1995; Ellis, 1997; Osborne, 2000*).

La presencia de receptores estrogénicos y progestágenos en el epitelio cervical y la presencia de lesiones relacionadas a VPH sugieren una respuesta hormonal local lo cual puede contribuir al desarrollo de carcinomas del cuello uterino, específicamente adenocarcinomas, lo cual se ha observado por Lacey y cols al encontrarse una asociación positiva entre los adenocarcinomas cervicales y la utilización de terapia hormonal de reemplazo (*Lacey, 2000*).

La inducción hormonal de la expresión génica viral puede constituir uno de los numerosos eventos en la etiología de la carcinogénesis cervical. Los elementos de respuesta hormonal del VPH pueden modular la transcripción de E6 y E7. Un aumento en las concentraciones de éstas proteínas resultan en un incremento en la posibilidad de asumir el estado morfológicamente transformado de la célula infectada, en consecuencia altas concentraciones de algunas hormonas esteroideas pueden constituir factor de riesgo en la carcinogénesis cervical (*Chan, 1998; Kim, 2000*).

JUSTIFICACION

El cáncer cervico-uterino es un problema de salud pública de nuestro país a pesar de los esfuerzos que se realizan para su detección temprana. La mayoría de los casos por lo tanto, se presentan en etapas avanzadas en donde el tratamiento no es del todo satisfactorio. La disponibilidad de nuevos agentes terapéuticos incluyendo sustancias anti-angiogénicas (anticuerpos monoclonales contra el VEGF, talidomida, interferones, etc) hace necesario tener un conocimiento más profundo del papel de la angiogénesis en el desarrollo y progresión del cáncer cervico-uterino.

Los factores de crecimiento tales como el VEGF son necesarios para la formación de nuevos vasos y se relaciona con la aparición del genotipo angiogénico. Por otra parte, las oncoproteína E6 del VPH esta claramente implicada en la etiología y progresión de este tumor por lo que se justifica estudiar el papel de ésta en la regulación de la expresión del VEGF, así como su interacción con ciertas hormonas.

HIPOTESIS

HIPOTESIS NULA

La expresión del gene E6 del VPH 18 prototipo (WT) y una variante del mismo no incrementan la expresión del VEGF en la línea celular derivada de cáncer mamario MCF-7 y no hay ninguna interacción con estradiol y progesterona, ni con sus antagonistas.

HIPOTESIS ALTERNA

La expresión del gen E6 del VPH 18 prototipo (WT) y de una variante aumentan la expresión de VEGF en la línea celular MCF – 7.

Los niveles de VEGF serán mayores en las células tratadas con estradiol y progesterona que las no tratadas.

La utilización de anti-estrógenos y anti-progestágenos tendrán efectos inhibitorios en los niveles de VEGF.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto de las hormonas sexuales y de sus antagonistas sobre la expresión de VEGF en la línea celular MCF-7 que expresa el gen del VPH E6 y de una variante.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Analizar la expresión de VEGF mediante ELISA en la línea celular MCF -7 con y sin expresión de E6 del VPH 18 y una variante.
- 2.- Analizar la expresión de VEGF al agregar estradiol y/o progesterona al medio de cultivo de la línea celular MCF-7 con y sin expresión de E6 del VPH 18 y una variante.
- 3.- Analizar la expresión de VEGF al agregar estradiol y/o progesterona mas un inhibidor de las mismas hormonas al medio de cultivo de la línea celular MCF-7 con y sin expresión de E6 del VPH 18 y una variante.

MATERIAL Y METODOS

Células y condiciones de cultivo

La línea celular MCF-7 de cáncer de mama es negativa para VPH y es sensible al estímulo hormonal y anti-hormonal, ya que expresa receptores de estradiol y progesterona (*Nawas, 1999; Ruohola, 1999*).

Las células se cultivaron en medio DMEM/F12, suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) al 5% en cajas de cultivo (Nunc, Roskilde, Dinamarca) hasta llegar a una confluencia del 80%, tiempo en que se realizaron todos los experimentos.

Transfección

Se cuentan con los vectores de expresión para eucariotes pCDNA3 el cual contiene las secuencias del gen E6 del virus del papiloma humano 18 y de una variante. Así mismo, éste vector contiene integrado el gen de resistencia al análogo de neomicina (G418).

Las células se tranfectaron, seleccionaron y expandieron antes de ser investigadas para confirmar si expresaban E6 wt y E6 Var2, mediante Western Blot. Para obtener clonas control, se realizó la transfección vacío, es decir, sin las secuencias de los genes de E6.(Fig. 1).

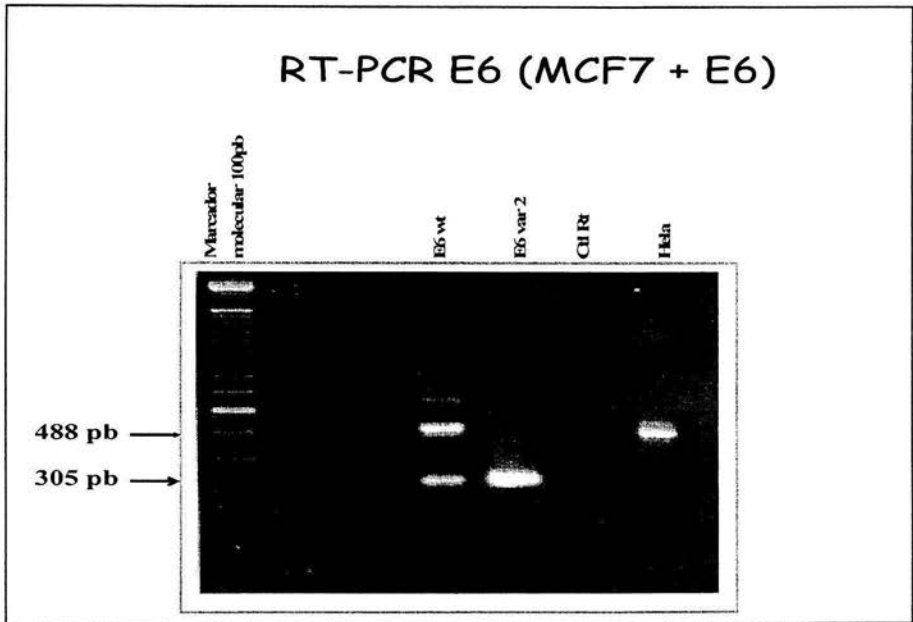


Fig. 1 ANALISIS DE LA EXPRESION DE LOS GENES E6 MEDIANTE RT-PCR

Aplicación de Drogas

Una vez verificada la expresión de E6 (Fig. 1) y continuando el crecimiento celular en cajas de cultivo con DMEM/F12 suplementado con SFB 10%, llegando a una confluencia del 80% se procedió al desprendimiento celular con tripsina sembrándose 25,000 células en pozos de cultivo cambiándose ahora el medio a RPMI sin rojo fenol suplementado con SFB 5% desactivado por filtración con carbón dextrán y dejándose cultivar por 24 hrs., se procedió a la aplicación de Estradiol (E2) a dosis de 1 nM, Progesterona 10 nM, el antiestrógeno ICI-182.780 1 μ M, y el antiprogestágeno RU-486 1 μ M.

Se procedió a la recolección del sobre-nadante de cada uno de los pozos y se congeló a -70°C. Los tiempos a los que se tomaron estas muestras fueron a las 12, 24 y 36 horas después de la aplicación de los medicamentos.

ELISA para VEGF

La producción de VEGF se cuantificó mediante ELISA específica para proteína VEGF humana o de ratón, tal como lo describe el fabricante. Los resultados se expresaron tanto en concentración absoluta de VEGF (en pg/ml; ej. Producción de VEGF en pg / ml / 10^6 células/tiempo de acondicionamiento; 6-48 hrs), o como porcentaje de cambio comparado con los controles respectivos.

Descripción del Ensayo

Los ensayos biológicos para VEGF se basan en sus efectos proliferativos en células endoteliales no son 100% específicos. El inmunoensayo para VEGF Quantikine es una fase sólida de ELISA diseñada para medir los niveles de VEGF 165 en sobrenadantes de cultivos celulares, suero y plasma. Contiene VEGF 165 recombinantes humano y anticuerpos desarrollados contra la proteína recombinante. Los resultados obtenidos para VEGF humano natural y el VEGF 121 humano recombinante muestran curvas lineares que son paralelas a las curvas estándar obtenidas al utilizar los Kits Quantikine. Estos resultados indican que este kit puede ser utilizado para determinar valores relativos de VEGF humano natural.

Principios del Ensayo

Este ensayo utiliza la técnica de inmunoensayo enzimático cuantitativo en sándwich. Se ha adherido un anticuerpo monoclonal específico para VEGF a la microplaca. Tanto los estándares como las muestras se pipetea dentro de los pozos y cualquier cantidad de VEGF presente se une mediante el anticuerpo inmovilizado. Después de lavar todas las sustancias no adheridas, se agrega un anticuerpo policlonal específico ligado a una enzima. Después de lavar para eliminar todo el reactante anticuerpo-enzima no adherido se agrega una solución de sustrato desarrollándose color, siendo la intensidad del mismo directamente proporcional a la cantidad de VEGF adherido en el paso inicial. Se desarrolla una reacción colorimétrica y la intensidad de la misma es evaluada.

Limitaciones del procedimiento

Si bien la calidad del producto es alta, por sí mismo el procedimiento tiene algunas limitaciones.

Las limitaciones más importantes serían:

- 1) Es un instrumento solo para uso experimental no diagnóstico.
- 2) Es importante que el diluyente de calibración sea el adecuado para el tipo de muestras que se vayan a utilizar.
- 3) Si las muestras generan valores mayores que el estándar es necesario diluir las muestras.
- 4) Es importante poner mucha atención en la técnica ya que cualquier variación en el diluyente estándar, la técnica de pipeteo, la técnica de lavado, el tiempo y la temperatura de incubación pueden alterar los datos que se obtengan.
- 5) Los receptores solubles o algunas otras proteínas disueltas en las muestras pueden no interferir con las mediciones sin embargo no puede ser excluida en un momento dado.

REACTIVOS QUE INCLUYE

- a) Microplaca de VEGF: Consiste en una microplaca de poliestireno de 96 pozos (12 filas de 9 pozos cada una) recubiertos de un anticuerpo monoclonal murino contra VEGF.
- b) Conjugado de VEGF: 12 ml de un anticuerpo policlonal contra VEGF conjugado con peroxidasa.
- c) Estándar de VEGF: Tres alícuotas (2000 pg/ alícuota) de VEGF 165 recombinante humano en una base de proteínas amortiguadas, liofilizado.
- d) Diluyente de ensayo RD1W: 11 ml de proteína amortiguada base.
- e) Diluyente calibrador RD5K: 21 ml de proteína base amortiguada.
- f) Concentrado de amortiguador para lavado: 21 ml de una solución concentrada 25 veces de surfactante amortiguado.
- g) Reactivo de Color A: 12.5 ml de peróxido de hidrógeno estabilizado.

- h) Reactivo de Color B: 12.5 ml de cromógeno estabilizado (tetrametilbencidina).
- i) Solución de paro: 6 ml de 2 N ácido sulfúrico.
- j) Cubiertas de la placa: Cuatro tiras adheribles.

Otros insumos necesarios:

- 1) Lector para microplaca que sea capaz de medir absorbancia a 450 nm, con sistema de corrección de longitud de onda a 540 nm o 570 nm.
- 2) Pipetas y puntas para pipeta.
- 3) Agua destilada o desionizada.
- 4) Pipeta multicanal o un lavador de microplaca.
- 5) Cilindro graduado de 500 mL.
- 6) Tubos de polipropileno de 12 mm x 75 mm.

Precauciones: La solución de parado es una solución ácida por lo que es necesario utilizar protección en la ropa, manos y ojos al momento de su utilización.

Recolección y almacenaje de las muestras: Ya que en nuestro ensayo se utilizará sobrenadante de cultivos celular se debe de tomar en cuenta que el medio de cultivo debe de tener por lo menos 1% de suero fetal bovino para la estabilidad del VEGF. Será necesario eliminar las partículas mediante centrifugación y realización inmediata del ensayo o hacer alícuotas y guardarlas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, evitando procesos de congelamiento y descongelamiento.

Preparación de los reactivos:

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente.

Solución de Lavado: Diluir 20 ml del concentrado de la solución de lavado en agua destilada o desionizada hasta completar 500 ml de solución.

Solución Sustrato: Las soluciones de color A y B se deben de preparar dentro los 15 minutos antes de su utilización. Protegerlos de la luz y se requieren 200 μ l de cada una de la soluciones por cada pozo.

Estándar de VEGF: Reconstituir el estándar de VEGF con 1 ml de Diluyente de calibración RD5K, lo cual dará una solución a 2000 pg/ml. Dejar el estándar en reposo por 15 minutos antes de hacer las diluciones.

Diluciones: Utilizar tubos de polipropileno. Agregar 500 μ l del diluyente de calibración RD5K en cada tubo. Utilizar la solución de sotck para producir una serie de diluciones (ver la figura). Mezclar perfectamente antes de hacer la transferencia al siguiente tubo. La dilución a 1000 pg/ml se utiliza como el gran estándar. El diluyente de calibración RD5K se utiliza como el estándar cero (0 pg/ml).

REALIZACION DEL ENSAYO

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente y se recomienda hacerlos por duplicado (Fig. 2).

- 1) Preparar todos los reactivos y soluciones.
- 2) Agregar 50 μ l del diluyente de ensayo RD1W en cada pozo.
- 3) Agregar 200 μ l del estándar o muestra en cada pozo. Cubrir con tela adhesiva e incubar por dos horas a temperatura ambiente.
- 4) Aspirar cada pozo y lavar, repitiendo el proceso dos ocasiones para tener un total de tres lavados. El lavado se realiza agregando 400 μ l de solución de lavado. Retirar todo el líquido antes de cada lavado.
- 5) Agregar 200 μ l del conjugado de VEGF a cada pozo. Cubrir con tela adhesiva e incubar por 2 horas a temperatura ambiente.
- 6) Repetir el proceso de lavado como se marca en el paso 4.
- 7) Agregar 200 μ l de solución sustrato en cada pozo y proteger de la luz. Incubar por 20 minutos a temperatura ambiente.

8) Agregar 50 μl de solución de paro en cada pozo. Sino hay un cambio de color en forma uniforme mover gentilmente la placa para asegurarse que se hace una mezcla adecuada.

9) Determinar la densidad óptica de cada pozo en menos de 30 minutos utilizando una lectora de microplaca a una longitud de onda de 450 nm haciendo corrección a 540 o 570 nm, lo cual corregirá las imperfecciones ópticas de la placa. El no hacerlo proporcionará datos más altos y poco precisos.

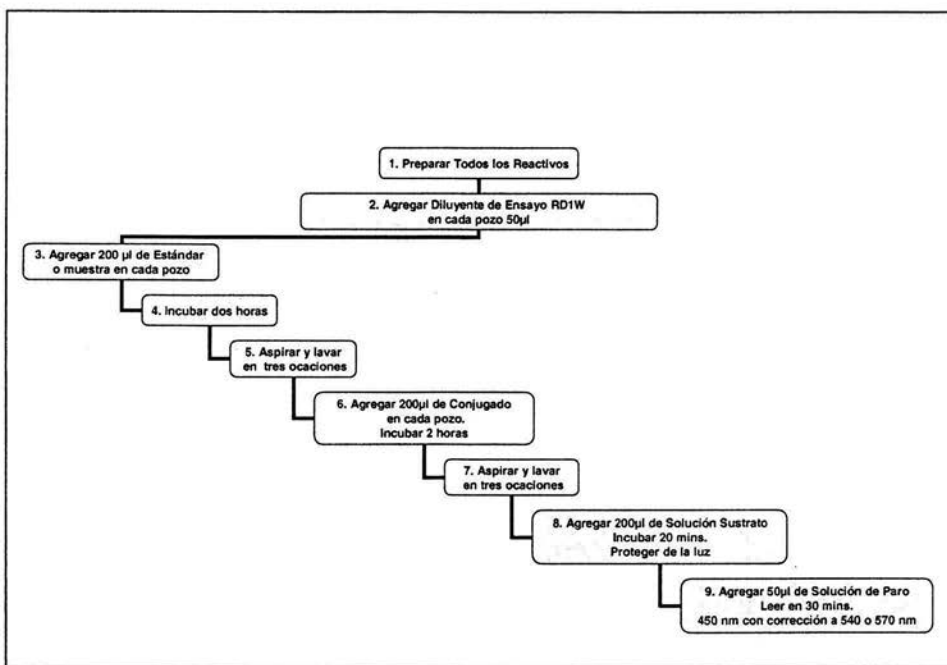


Figura 2 ESQUEMA DE REALIZACION DEL ENSAYO PARA LA DETERMINACION DEL VEGF.

Cálculo de resultados

Construimos una curva estándar mediante la colocación de la absorbancia promedio de cada estándar en el eje de las y, y la concentración en el eje de las x dibujando la curva que mejor se ajuste. Los datos se pueden linearizar mediante la gráfica del log de la concentración de VEGF versus el log de la densidad óptica y la mejor línea se determina mediante un análisis de regresión.

Sensibilidad del ensayo

Utilizando el diluyente de calibración RD5K la cantidad mínima detectable de VEGF es menor a 5.0 pg/ml. El mínimo detectable ha sido determinado agregando dos desviaciones estándar a la densidad óptica promedio de 20 duplicados estándar y calculando su respectiva concentración.

Especificidad del Ensayo

El ensayo reconoce VEGF humano natural o recombinante y no se ha encontrado interferencia con una serie de factores relacionados con VEGF (ej. rhPlGF, rmPlGF-2, rmVEGF120, rmVEGF164, rhVEGF165/PlGF).

Calibración

El inmunoensayo ha sido calibrado contra VEGF 165 humano recombinante altamente purificado y producido por R&D Systems.

Análisis de Datos

Todos los resultados son representativos de tres experimentos reproducibles en forma independiente.

Se realizó descripción en números absolutos y porcentajes de los resultados así como aplicación de la prueba de ANOVA de una vía para correlaciones.

RESULTADOS

Una vez que se realizó la transfección y se verificó la expresión de los genes E6 en las clonas (Fig 1), se realizaron los cultivos celulares de la línea MCF-7 con DMEM/F12 suplementado con SFB 10%, y llegando a una confluencia del 80%, se procedió al desprendimiento celular con tripsina sembrándose en cajas de 25cm² de 24 pozos para cultivo celular, con fondo plano y tapa de baja evaporización (3524 Laboratorio Corning Incorporated COSTAR®) 10⁵ células por pozo con 1 ml de medio RPMI sin rojo fenol mas 10 % SFB desactivado con carbón dextrán (C/D) y a las 24 hrs. se lavó con PBS 1x, se agrega medio fresco y las drogas se agregaron en un vehículo de Et-OH (Grado Biología Molecular, Sigma®) a la siguiente concentración:

E2 = 1nM (1x10⁻⁹ M)

PG = 10nM (1x10⁻⁸ M)

ICI 182.780 = 1μM (1x10⁻⁶ M)

RU-486 = 1μM (1x10⁻⁶ M)

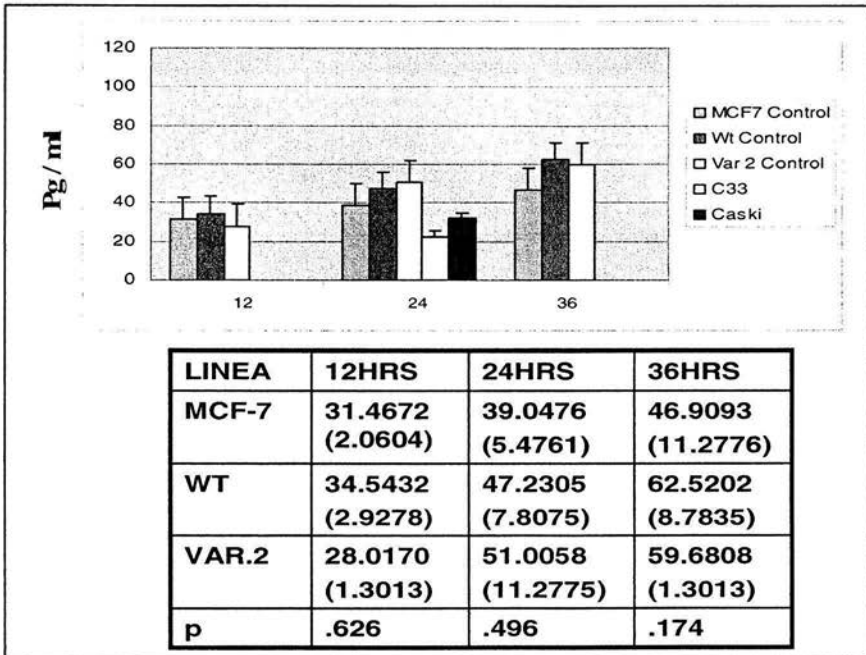
Se procedió entonces a la recolección de sobrenadantes de cada uno de los pozos y se congeló a -70° C, la recolección de los mismos se realizó a las 12, 24 y 36 hrs. después de la aplicación de los medicamentos.

La producción de VEGF se cuantificó mediante ELISA específica para proteína VEGF humana o de ratón (R&D/Systems) incluyendo su anticuerpo secundario. La cuantificación de VEGF se realizó utilizando un sistema de detección de quimioiluminiscencia como ya se ha mencionado previamente en la sección de ELISA para VEGF.

Los resultados se expresan tanto en concentración absoluta de VEGF (pg/ml) o como porcentaje de cambio comparado con los controles respectivos del proveedor.

EXPRESION DE VEGF EN LAS LINEAS CELULARES CONTROLES

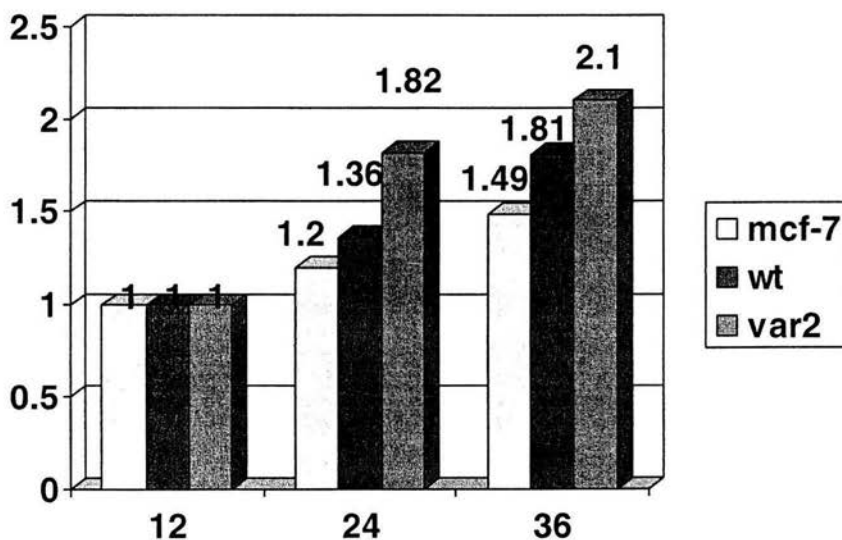
En los controles (considerando como control a la línea celular MCF-7 tanto transfectada con el gen E6-WT o el gen E6-Var2 como la no transfectada) observamos un incremento gradual en la producción de VEGF en relación al tiempo en cada línea celular. Así tenemos que para MCF-7 sin transfectar, la producción del factor se incrementa de 31.46 ± 2.06 pg/ml a las 12hrs de cultivo hasta 46.91 ± 11.28 pg/ml a las 36hrs y observamos que en la línea transfectada con el gen WT la expresión del factor llega a ser de hasta 62.52 ± 8.78 pg/ml a las 36 hrs, lo cual es un incremento de 15.61 pg/ml que representa un incremento del 33.27% en comparación con la línea celular no transfectada, aún con este incremento porcentual importante al realizar la evaluación no se encontró diferencia estadísticamente significativa.



Cuadro 1. EXPRESION DE VEGF EN LOS CONTROLES. Valores expresados en pg/ml de cada una de las líneas celulares a los diferentes tiempos de recolección. P es el valor de significancia estadística de la prueba de ANOVA

Algo similar sucedió cuando se evaluó la línea celular transfectada con la variante del gen (VAR-2), donde observamos que aunque a las 12 hrs se encontró que la producción del factor fue del 10.96% menor, esto cambió a lo largo del tiempo teniendo una producción a las 36hrs similar que en la línea celular transfectada con el gen WT, y una vez más al realizar el análisis estadístico no se encontraron diferencias significativas. Cuando se realizó el análisis entre las líneas celulares dependiendo de si estaban transfectadas o no y a lo largo del tiempo de cultivo no hay diferencia estadística significativa que nos haga pensar que hay diferencia en la producción de VEGF dependiendo de la línea celular o variante (Cuadro 1).

Al analizar el incremento en número de veces de incremento de la producción de VEGF por cada línea celular vemos claramente que la VAR-2 es la que más tiene incremento en la producción de VEGF de hasta 2.1 veces en comparación con el resto de los controles (Cuadro 2).



Cuadro 2. EXPRESION DE VEGF EN LOS CONTROLES, INCREMENTO EN NUMERO DE VECES. Se toma la expresión del VEGF a las 12 hrs como el basal y se observa el incremento conforme pasa el tiempo, aquí se observa un incremento mayor en la línea transfectada con VAR-2

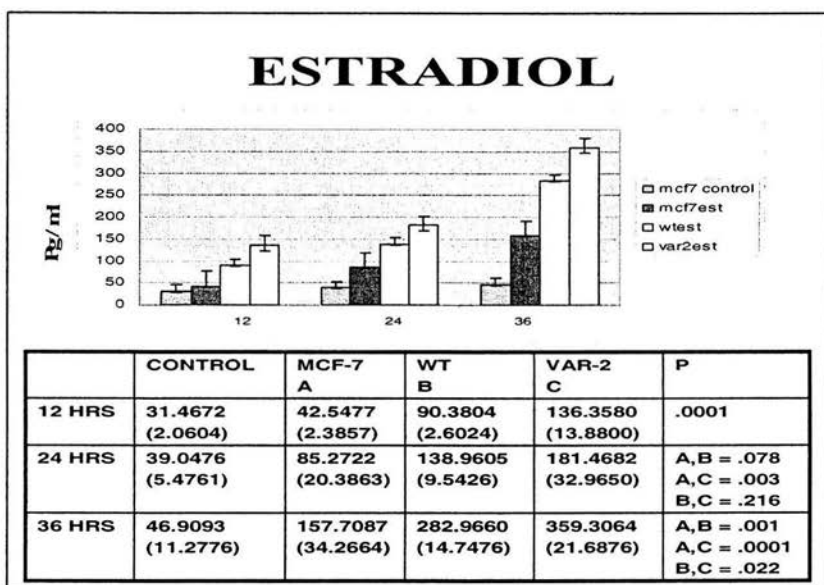
INFLUENCIA DEL ESTRADIOL EN LA EXPRESION DEL VEGF

Cuando agregamos estradiol a cada línea celular y la comparamos con el control (sin medicamento) observamos que el efecto del mismo es evidente tanto en la línea celular MCF-7 sin transfección con un incremento en la producción del factor de 1.3 veces comparado con el control desde las 12 hrs hasta 3.3 veces. El valor inicial sin medicamentos comparado con el cultivo a 36hrs, lo cual muestra una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$). Además observamos que en la línea celular transfectada con VAR-2 el efecto es mayor obteniendo datos crudos de producción de VEGF que van desde 136.36 ± 13.88 pg/ml hasta 359.301 ± 21.69 pg/ml, lo cual representa un incremento en la producción del factor de 4.3 veces hasta 7.6 veces en relación con el valor inicial del control. Tomando en cuenta que para los controles no encontramos diferencias significativas en la producción del factor decidimos tomar como valor de referencia el de MCF-7.

Efectos similares encontramos en la línea transfectada con el gen WT de E6 de VPH 18 donde encontramos elevación en la expresión del VEGF de 2.8 veces (90.38 ± 2.60 pg/ml) hasta 6 veces (282.96 ± 14.75 pg/ml) el valor de referencia de VEGF, lo cual es estadísticamente mayor comparado con el control a las 12hrs ($p < 0.0001$), disminuyendo esa diferencia a las 24 hrs y volviéndose a instalar a las 36 hrs de incubación con la droga ($p = 0.001$).

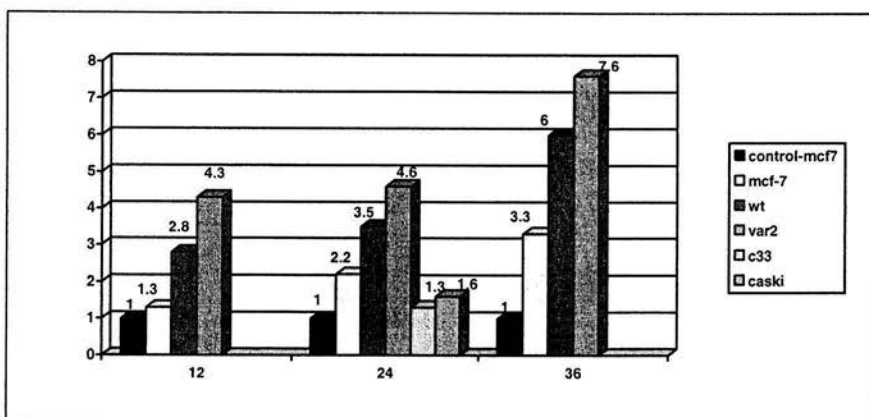
Esta mayor producción de VEGF la pudimos observar en la VAR-2, sin embargo cuando tratamos de encontrar alguna diferencia en la producción de VEGF entre el WT y la VAR-2 no fue posible a las 24hrs ($p = 0.216$) pero sí a las 36 hrs con una mayor producción de VEGF por parte de la VAR-2 ($p = 0.022$) (Cuadro 3).

Intentamos ver si había una influencia del estradiol sobre una línea celular de cáncer cervicouterino que nativamente expresa VPH (CASKI) y otra que no lo expresa (C33) y no fue posible determinar diferencias estadísticamente significativas.



Cuadro 3. INFLUENCIA DEL ESTRADIOL EN LA EXPRESION DEL VEGF. Valores expresados en pg/ml de cada una de las líneas celulares a los diferentes tiempos de recolección posterior al añadir el estradiol. P es el valor de significancia estadística de la prueba de ANOVA

Al realizar una evaluación en el incremento de la producción de VEGF en relación con la influencia del estradiol pudimos encontrar un incremento exponencial con el paso del tiempo no teniendo relación con la dosis ya que es la misma para las tres líneas celulares. En relación con los controles vimos que la línea celular que mas respondía fue la línea transfectada con VAR-2, desde las doce horas de exposición al estradiol hay incremento de hasta 4.3 veces hasta 7.6 veces a las 36 horas, como se observa en el cuadro 4.



Cuadro 4. INFLUENCIA DEL ESTRADIOL EN LA EXPRESION DEL VEGF, INCREMENTO EN NUMERO DE VECES. Se toma la expresión del VEGF a las 12 hrs como el basal y se observa el incremento conforme pasa el tiempo, aquí se observa un incremento mayor en la línea transfectada con VAR-2 posterior al añadir el estradiol.

INFLUENCIA DE LA PROGESTERONA EN LA EXPRESION DEL VEGF

Al agregar Progesterona (P) a los medios de cultivo con las diferentes líneas celulares observamos lo siguiente:

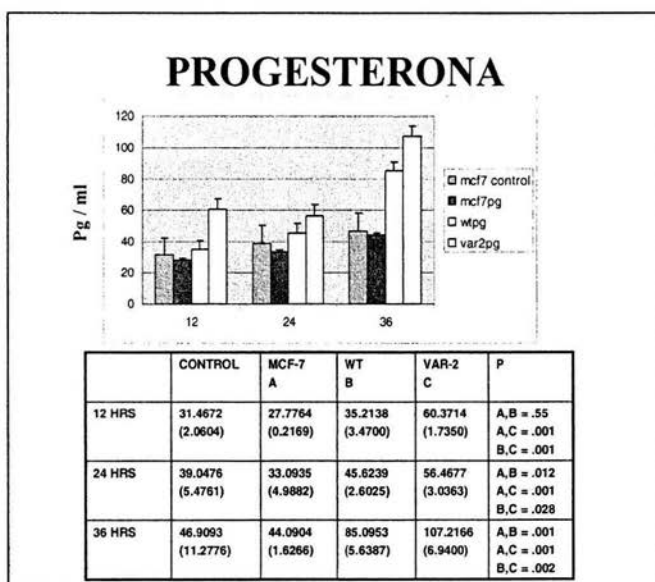
Al añadir esta hormona a la línea celular MCF-7 se producía una disminución en la producción del VEGF, lo cual podría esperarse ya que esta línea tiene receptores para P y como efecto se espera la diferenciación celular, lo cual evita que se replique y no se exprese el VEGF, este efecto se mantiene durante todo el tiempo de incubación.

El añadir P a la línea celular transfectada con E6-WT se produce un incremento de la producción de VEGF que va de 1.1 veces (35.21 ± 3.47 pg/ml) hasta 1.8 veces (85.10 ± 5.64 pg/ml) en comparación con sus controles a lo largo de los tiempos de cultivo establecidos. Los incrementos que son estadísticamente significativos se observan a las 24hrs ($p = 0.012$) y 36 hrs ($p = 0.001$) respectivamente.

Datos similares encontramos al agregar P a la línea transfectada con la E6- VAR-2. Se observó un incremento casi del doble (1.9 veces) a las 24 hrs con valores de VEGF de 60.37 ± 1.73 pg/ml hasta 2.2 veces (107.22 ± 6.94 pg/ml) a las 36 hrs de incubación, lo cual es significativamente mayor a lo largo del tiempo ($p = 0.001$).

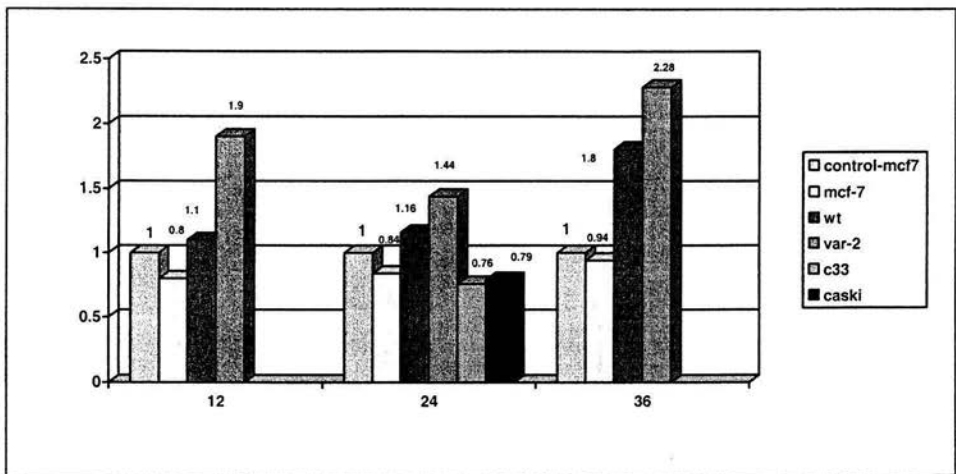
Al comparar los resultados entre las líneas que expresan E6-WT y E6-VAR-2 encontramos que VAR-2 tiene una mayor influencia por parte de la P en la expresión del factor que WT, siendo significativamente mayor para VAR-2 en los tres tiempos de evaluación ($p = 0.028$ hasta $p = 0.001$).

Al igual que el estradiol intentamos ver si había una influencia de la progesterona sobre una línea celular de cáncer cervicouterino que nativamente expresara VPH (CasKi) y otra que no lo expresara (C33) y no fue posible determinar diferencias estadísticamente significativas. (Cuadro 5).



Cuadro 5. INFLUENCIA DE LA PROGESTERONA EN LA EXPRESION DEL VEGF. Valores expresados en pg/ml de cada una de las líneas celulares a los diferentes tiempos de recolección posterior al añadir la Progesterona. P es el valor de significancia estadística de la prueba de ANOVA

Al realizar una evaluación en el número de veces de incremento en la producción de VEGF observamos que la línea celular no transfectada mostraba un decremento en la producción del factor en comparación con los controles a los diferentes tiempos. En las diferentes líneas transfectadas observamos un incremento en la expresión del factor desde el 10% a las 12hrs hasta 228% a las 36hrs en la línea transfectada con VAR- 2, mientras que la línea transfectada con WT no muestra un incremento de mas del 80% a las 36 hrs lo cual representa que la VAR-2 responde más al estímulo de progesterona como se observa en el cuadro 6.



Cuadro 6. INFLUENCIA DE LA PROGESTERONA EN LA EXPRESION DEL VEGF. Se toma la expresión del VEGF a las 12 hrs como el basal y se observa el incremento conforme pasa el tiempo, aquí se observa un incremento mayor en la línea transfectada con VAR-2 posterior al añadir la Progesterona.

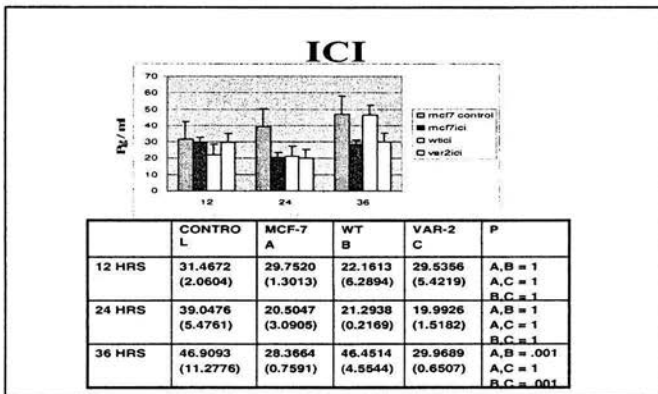
INFLUENCIA DEL ICI-182.780 EN LA EXPRESION DEL VEGF

El agregar ICI-182.780 que es un anti-estrógeno puro, observamos que en las primeras 12 hrs de incubación no se encontraba una disminución importante en la producción del factor de crecimiento en ninguna de las líneas celulares, aunque si había una reducción en la producción del VEGF no mayor del 30% en comparación con el valor de referencia ese valor no era estadísticamente significativo.

A las 24hrs de cultivo la tendencia continuaba igual con una reducción en la producción de VEGF mas importante para VAR-2 (19.99 ± 1.52 pg/ml) en comparación con el valor de referencia no fue factible encontrar una diferencia estadísticamente significativa entre las diferentes líneas celulares cuando se agregaba el ICI ($p=1$).

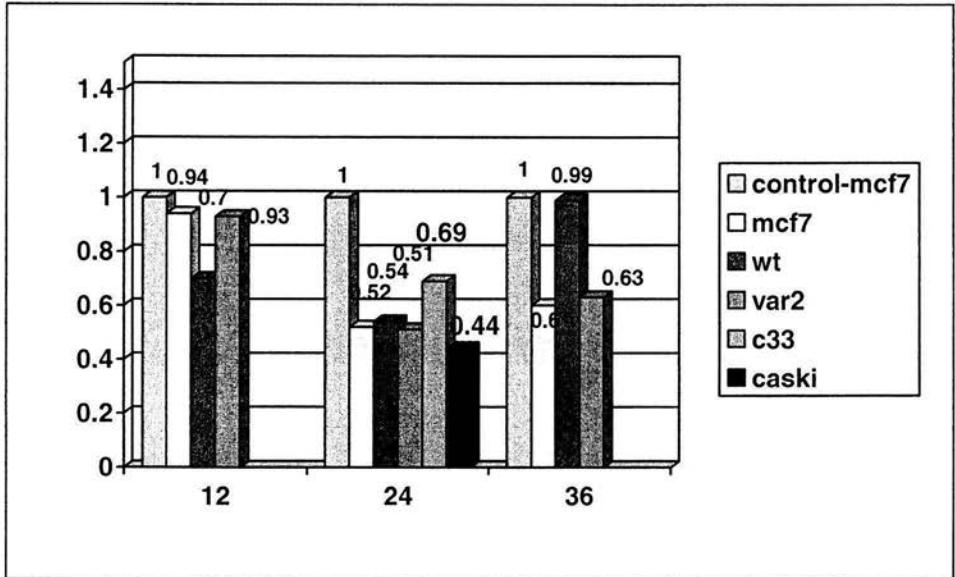
En la evaluación a las 36 hrs encontramos un efecto contradictorio en la línea celular con el gen WT donde efectivamente había un incremento en la producción de VEGF de hasta 46.45 ± 4.55 pg/ml en comparación con las otras dos líneas celulares que se cultivaban con ICI, este valor es muy similar con el valor de producción del VEGF en la línea celular incubada sin medicamentos. (Cuadro 7).

Intentamos ver si había una influencia del ICI sobre una línea celular de cáncer cervicouterino que nativamente expresará VPH (CasKi) y otra que no lo expresara (C33) y no fue posible determinar diferencias estadísticamente significativas.



Cuadro 7. INFLUENCIA DEL ICI EN LA EXPRESION DEL VEGF. Valores expresados en pg/ml de cada una de las líneas celulares a los diferentes tiempos de recolección posterior al añadir el ICI-182.780. P es el valor de significancia estadística de la prueba de ANOVA

Al observar el comportamiento de la producción de VEGF al aplicar el ICI observamos un decremento de hasta el 49% a las 24hrs en la línea transfectada con VAR-2 efecto que se sostiene a lo largo del tiempo mientras que en la línea transfectada con WT pierde al paso del tiempo llegando prácticamente a la línea basal en comparación con el control a las 36 hrs como claramente se observa en el cuadro 8



Cuadro 8. INFLUENCIA DEL ICI EN LA EXPRESION DEL VEGF, EXPRESADO EN CAMBIO EN VECES CON RESPECTO AL BASAL. Se toma la expresión del VEGF a las 12 hrs como el basal y se observa el incremento conforme pasa el tiempo, aquí se observa un inhibición mayor en la producción de VEGF en la línea transfectada con el Gen de E6 no importando si es WT o Var2.

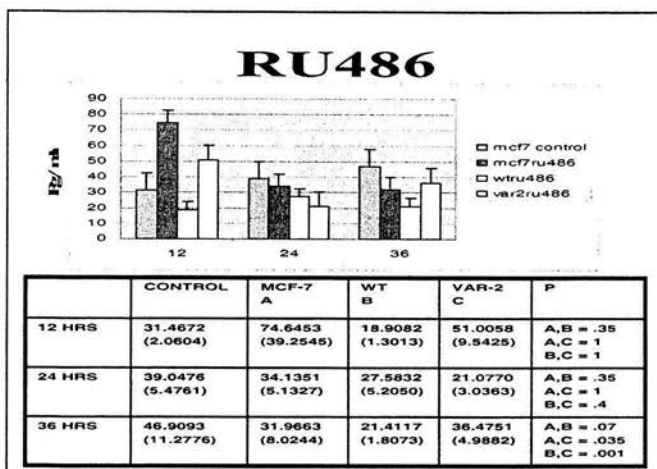
INFLUENCIA DEL RU486 EN LA EXPRESION DEL VEGF

Se agregó RU486 que es un anti-progestágeno, con el fin de intentar identificar que influencia podría tener el mismo en la expresión del VEGF; encontramos resultados poco alentadores ya que tanto en la línea celular MCF-7 como en la que expresa el gen E6 VAR – 2 a las 12 hrs de cultivo en presencia de la droga no se logró un efecto inhibitorio en la producción de VEGF sino por el contrario se encontró un incremento en la producción del mismo mas no en la línea celular que expresa el gen WT de la E6 donde si se observa una disminución en la producción del mismo.

A las 24 hrs de incubación la producción del factor de crecimiento es similar a la de la línea celular control sin la droga y se observa que entre las diferentes líneas celulares implicadas no se llega a observar una diferencia estadísticamente significativa.

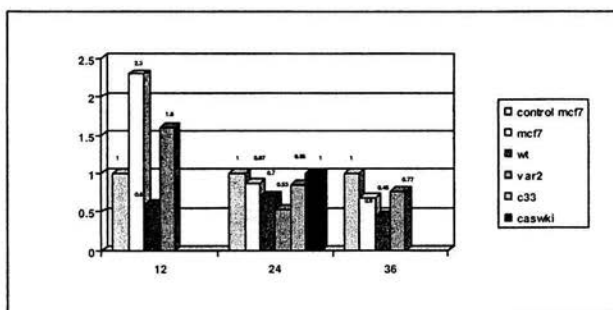
A las 36 hrs de cultivo se observa una persistencia en la inhibición de la producción del factor cuando se compara con la línea celular control sin droga. Se observa además, una inhibición mas pronunciada en la línea celular transfectada con el gen E6 WT cuando se compara con las otras dos líneas celulares dando la impresión de ser ésta la mas sensible a su acción, sobretodo en relación con el tiempo de exposición. (cuadro 9).

Intentamos ver si había una influencia del RU 486 sobre una línea celular de cáncer cervicouterino que nativamente expresará VPH (CASKI) y otra que no lo expresará (C33) y no fue posible determinar diferencias estadísticamente significativas, por lo que solo mostramos datos a las 24 hrs de incubación con la droga donde se observa claramente que no existe ninguna influencia de esa droga en estas líneas celulares, lo que puede orientar a pensar en que la producción de VEGF o el efecto inhibitorio en la misma tiene relación estrecha con el gen de E6 de un virus específico.



Cuadro 9. INFLUENCIA DEL RU- 486 EN LA EXPRESION DEL VEGF. Valores expresados en pg/ml de cada una de las líneas celulares a los diferentes tiempos de recolección posterior al añadir el RU486. P es el valor de significancia estadística de la prueba de ANOVA

Al revisar los cambios en la producción del VEGF con respecto al basal observamos que en la línea transfectada con VAR-2 a las 12hrs no hay inhibición sino incremento del 60% en la producción del VEGF, ocurriendo un efecto similar en la línea MCF-7 sin transfectar, en la que el incremento es de 2.3 veces comparado con el control, desapareciendo el efecto estimulador a las 24hrs en que la producción disminuye hasta en un 47% en relación con los controles manteniéndose a lo largo del tiempo como se muestra en el cuadro 10.



Cuadro 10. INFLUENCIA DEL RU- 486 EN LA EXPRESION DEL VEGF. Se toma la expresión del VEGF a las 12 hrs como el basal y se observa el incremento conforme pasa el tiempo, aquí se observa un inhibición mayor en la producción de VEGF en la línea transfectada con el Gen de E6 no importando si es WT o Var2.

DISCUSIÓN

El desarrollo de los tumores sólidos es un proceso en el que ocurren numerosos cambios que requieren la unión o colaboración de múltiples pasos clave (*Hanahan, 2000*) Una característica crítica que deben adquirir las células transformadas es la habilidad de obtener un mayor suplemento de nutrientes y oxígeno, lo cual se logra mediante la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis (*Bouck, 1996*).

Dada la importancia fundamental del desarrollo de angiogénesis para la progresión de las neoplasias malignas, es esperable que dentro de las aberraciones funcionales que los oncogenes del VPH producen se encuentren aquellas encaminadas al desarrollo de la misma. En la actualidad hay evidencia suficiente que demuestra el papel tanto directo como indirecto de algunos oncogenes al alterar el balance entre factores proangiogénicos así como antiangiogénicos. Por ejemplo, en un modelo de queratinocitos transfectados con las oncoproteínas del VPH se ha demostrado que la expresión de E6 y E7 disminuye la expresión de trombospondina y maspina mientras que los niveles de interleucina 8 y VEGF se incrementan (*Toussain-Smith, 2004*).

En otro estudio se encontró que el oncogen *ras* activa la expresión de factores proangiogénicos como el VEGF mientras que la pérdida de la función de p53 conlleva a una disminución en la expresión de moléculas antiangiogénicas (*Munger, 2002*).

Por otra parte, las hormonas sexuales, estrógenos y progesterona han sido reconocidos como co-factores en el proceso de malignización de las células del cérvix uterino ya que hay una interacción con la transcripción de oncogenes virales del VPH (*Kim, 2000*). La proliferación inducida por estrógeno puede visualizarse como un mecanismo por el cual las células escamosas y glandulares del cérvix y vagina permiten la progresión maligna (*Sup Park, 2003*).

La característica más importante de las lesiones cervicales es la progresión de las mismas por diferentes estadios histopatológicos desde solo infección por VPH hasta carcinoma invasor (*Ganong, 1996*). La expresión continua de los genes E6 y E7 del VPH pueden causar desregulación persistente del ciclo celular lo cual facilita la inestabilidad genética (*Von Knebel Doeberitz, 1994*).

Actualmente, hay suficiente evidencia que demuestra, por ejemplo, que E6 y E7 actúan en diferentes pasos de la inmortalización de células del epitelio mamario humano, así como en otros tejidos; E7 actúa en forma temprana mediante la inactivación de la cascada p16-pRb lo que permite que haya una mayor supervivencia de las células y que E6 actúe en forma tardía a través de la activación de telomerasa (*Von Knebel Doeberitz, 1994*).

Es necesario recalcar que la mayoría de las lesiones cervicales que contienen virus de VPH de alto riesgo no progresan a lesiones invasoras, lo cual sugiere que existen factores ambientales o genéticos asociados a la carcinogénesis del VPH, tal es el caso de los estrógenos ya que se ha observado que estos incrementan la transcripción de las proteínas transformadoras del VPH-16 (*Warren, 1966; Shi, 1999*).

Uno de los mecanismo sugeridos es el incremento en la génesis vascular causado por estas hormonas, lo cual se encuentra bien evaluado en estudios observacionales que han mostrado que la mayor parte de los tumores cervicales aparecen en los sitios con mayor respuesta a estrógenos, esto es, la zona de transformación (*Webster, 2001*). Al mismo tiempo se incrementa la incidencia de detección de DNA del VPH durante el embarazo, así como en pacientes que utilizan anticonceptivos orales combinados por periodos prolongados de tiempo, llegando a incrementar la tasa de riesgo de desarrollo de cáncer cervicouterino en hasta 2 veces (*DiSaia, 1999*).

Otro dato importante que apoya el papel hormonal en el desarrollo de lesiones malignas en este sitio anatómico es que la expresión génica del VPH 18 varía durante el embarazo y se incrementa con la presencia de estrógenos y progesterona (*Michelin, 1997*). Aunque es claro que los estrógenos incrementan la proliferación celular teniendo como resultado

un mayor número de células que expresan E-6 y E-7 del VPH el mecanismo exacto en el que actúa en forma sinérgica no se conoce (*Webster 2001*).

Se ha observado que la expresión cíclica de oncoproteínas del VPH 18 con una exposición elevada a estrógenos puede ser necesaria para iniciar la carcinogénesis cervical, mediante la sobre-regulación de la transcripción viral (*Sup Park, 2003; Buró, 2003*), evidencia de lo anterior son los estudios sobre receptores hormonales en tumores cervicales intentando dar valor a los mismos como factores pronósticos y como factores predictivos de respuesta al tratamiento instituido (*Suzuki, 2000*), aunque el mecanismo exacto por el cual las hormonas esteroideas incrementan el riesgo para desarrollar cáncer no es claramente entendido(*Webster 2001*), tal como lo mencionamos anteriormente.

Se ha demostrado que el uso de ICI bloquea la inducción de VEGF mediada por estradiol, sin embargo hay algunos datos que sugieren que el antiestrógeno bloquea selectivamente la inducción de otros genes relacionados al VEGF, lo cual muestra que hay diferencias en los mecanismos por los cuales los estrógenos inducen este factor de crecimiento, así como la expresión de otros genes (genes tempranos, factores de crecimiento y proto-oncogenes) (*Hyder, 1998*).

En estudios con líneas celulares que expresan receptores hormonales (ej. MCF-7) la expresión de VEGF puede ser modificada dependiendo del medio de cultivo utilizado, así tenemos que existe una disminución en forma importante de su producción en medios libres de rojo fenol, tal y como lo utilizamos en nuestro estudio, de la misma manera que se modifica en forma independiente por cada uno de los compuestos anti-hormonales utilizados, como muestra Hyder y cols. donde existe una disminución en la producción de VEGF al agregar en forma independiente RU486 (*Hyder, 1998*). Jensen y cols muestra específicamente que la utilización de medios de cultivo libres de suero y sin rojo fenol inhibe el crecimiento celular en hasta el 20% en comparación con controles, concluyendo que se trata de un fenómeno mediado vía receptor y así mismo inhibe la expresión de genes regulados positivamente por estrógeno, por ejemplo Erb B-2 (*Jensen, 2003*).

En base a lo anterior, dada la interacción entre las hormonas sexuales, la presencia del VPH y el efecto proangiogénico de esos factores decidimos evaluar en un modelo de cáncer de mama con la línea celular MCF-7 -la cual expresa el RE y el RP y es hormonorespondedora-, si la expresión constitutiva del encogen E6 modifica la respuesta angiogénica -evaluada mediante los niveles de VEGF- de esta línea al estradiol, progesterona y sus respectivos inhibidores, en medios de cultivo libres de suero y rojo fenol.

Nuestros resultados demuestran que en la línea MCF-7 control o no transfectada con E6, el estradiol incrementa la producción de VEGF, sin embargo, esta mayor producción se incrementa aún mas en las líneas que expresan E6 de hasta 7.6 veces lo que sugiere que el estradiol podría estar induciendo mayor expresión de la oncoproteína viral y que esta a su vez activara transcripcionalmente la expresión de VEGF (*Sup Park, 2003; Stafl, 1977; Abulafia, 1996; Watson, 1994; Smith-McCune, 1994; Folkman, 1995; Dobbs, 1997; Srivastava, 1998*). En relación al efecto de la progesterona, siendo nuestros datos similares a los resultado de otros autores como Nakamura y cols al comparar el efecto prostestacional encontramos un incremento de hasta dos veces en la expresión de VEGF a las 36 hrs lo cual es compatible con lo reportado sobre el uso de esta hormona para estimulación de este factor (*Nakamura, 1996*). Hyder y cols en su estudio sobre células T47-D que son ricas en receptores de progesterona, observa un incremento en la producción de VEGF hasta 4 veces mayor en comparación con el control y en condiciones experimentales es hormono específico, tal como nuestros resultados muestran (*Hyder, 1998*).

Lo anterior puede ser explicado ya que existe evidencia clara, tanto histórica como en estudios recientes, que muestran que tanto los estrógenos como la progesterona regulan la expresión de diversos factores proangiogénicos, dentro de los que se encuentran el VEGF y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y junto a esto tenemos los ejemplos terapéuticos claros en los que la castración médica mediante la administración

de agonistas de la GnRH disminuyen el tamaño de lesiones uterinas benignas (miomas uterinos) (Hyder, 2000).

Se considera que el efecto estrogénico primario es mediado por receptor hormonal (RE) ya que la inducción en la expresión del VEGF es muy rápida y es bloqueada por antiestrógenos puros (Hyder, 1999) es inhibido por actinomicina D pero no por puromicina (Cullian-Bove, 1993). Del mismo modo se han identificado EREs funcionales en el gen del VEGF (Hyder, 2000). La evidencia de este tipo de regulación por estrógenos es consistente en los diferentes estudios que lo evalúan, siendo los mas importantes los que miden la expresión de este factor a lo largo del ciclo de estrógeno tanto en modelos en ratones (Karuri, 1998) como en el ciclo menstrual del humano (Shirfren, 1996).

En cuanto a la progesterona, su papel en la expresión del VEGF no ha sido tan bien estudiada como los estrógenos, sin embargo hay modelos celulares en los cuales la progesterona incrementa la expresión del VEGF mientras que el antagonista RU-486 bloquea el efecto de la misma, lo cual sugiere que la expresión es mediada por el receptor de progesterona (PR) (Hyder, 1998).

Con la información existente hasta la actualidad hay evidencia suficiente para pensar que la expresión de VEGF es controlada por las hormonas sexuales, sin embargo es poco lo que se conoce sobre los mecanismos moleculares que regulan la expresión en el tracto genital, además de existir grandes diferencias entre los diferentes tipos de líneas celulares y en las diferentes especies (Hyder; 2000).

Interesantemente y conforme a lo esperado, se observa que en las células que expresan E6 el efecto sobre los niveles de VEGF es mayor debido a que el gen que la expresa contiene una serie de elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE). En presencia de ellos la GRE aumenta la transcripción de E6/E7 estimulando tanto la proliferación celular como el crecimiento tumoral (Weidner,1991; Wiggins, 1995; Dellas, 1997).

Hay evidencia suficiente que demuestra la habilidad de las hormonas esteroideas para potenciar el crecimiento de los tumores cervicales por medio de la inhibición de la regulación del ciclo celular lo cual interfiere con la eliminación de las células infectadas por parte del sistema inmune (*Stöppler, 1996; Buró, 2003*).

En el trabajo de Morales-Pezase sugiere que la administración de antagonistas hormonales como RU486 puede ser de utilidad para inhibir la expresión de oncogenes del VPH 18 en carcinomas cervicales (*Morales-Peza, 2002*). En nuestro estudio, las células tranfectadas con var-2 a las que administramos ICI, que es un antiestrógeno puro, muestran este efecto inhibitor mas no en aquellas tranfectadas con WT, donde conforme pasa el tiempo ese efecto inhibitor se pierde produciendo mas que inhibición un incremento en la producción del VEGF.

El efecto estrogénico puede ser inhibido con un anti-estrógeno puro como es el ICI 182.780, el cual es bien conocido que bloquea muchas respuestas dependientes de la activación del receptor de estrógenos. Los anti-hormonales como el ICI 182.780 y RU-486 no siempre inhiben el incremento de VEGF inducido por estrógenos, como se observa en nuestro estudio en la determinación de las 36 hrs, en la cual observamos una diferencia estadística importante. Los mecanismos de acción tisular específicos de los anti-estrógenos puede ser determinado por la habilidad de los receptores estrogénicos a sus formas homo o heterodímeras y a las señales en diferentes vías dependiendo de los ligandos, promotores y estimuladores, así como co-factores nucleares disponibles (ref).

En años recientes se ha propuesto que mínimos cambios en el genoma de los diferentes tipos de VPH producen diferentes patrones de comportamiento en las lesiones que producen y algunos estudios muestran que estas variaciones confieren diferentes grados de riesgo para el desarrollo de lesiones cervicales malignas (*Hildesheim, 2001*). Pocos estudios evalúan el significado funcional de las variaciones genómicas o de las proteínas dentro de las variantes del VPH. Se ha reportado que las variaciones en la secuencia de la región controladora larga (LCR) de un aislado de VPH 16 tipo Asiatico-americano puede ser la responsable de un aumento en la actividad transcripcional. (*Kammer, 2000*)

Hecht y cols han sugerido que las variaciones genómicas de los diferentes tipos de aislados de VPH 18 pueden ser las responsables de una gran espectro de enfermedades asociadas con el tipo viral. Estos autores han identificado una variante de VPH 18 que se encuentra hasta en el 40% de las lesiones intraepiteliales cervicales mas no se ha podido aislar en lesiones invasoras, lo cual puede sugerir un bajo potencial oncogénico en esta variante (*Hecht, 1995*).

Es importante mencionar que mutaciones a nivel de aminoácido puede afectar la habilidad de la proteína para interactuar con las proteínas celulares y así promover la transformación celular, sin embargo, los cambios silentes no son menos importantes y pueden afectar la expresión génica a nivel transcripcional, por último es importante recalcar que la reducción de uno o varios elementos transformadores no aseguran la perdida de la habilidad transformadora del virus pero si llevar a cambios en el comportamiento biológico de la lesión, en este caso, retrasando el proceso de transformación celular (*De la Cruz, 2005*).

Por otro lado hay estudios que muestran que las variantes de E6 de VPH16 pueden contribuir a la carcinogénesis o permiten que la célula infectada evada al sistema inmune del huésped (*Brady, 1999*). Nuestros resultados no pueden ser concluyentes en este aspecto ya que a solo se utilizó una sola clona de E6 wild type y una de la variante por lo cual los resultados en cuanto al efecto de la secreción basal de VEGF y posterior a la aplicación de los medicamentos podría deberse solo a variación clonal.

CONCLUSIONES

Nuestros resultados en la línea hormona dependiente MCF7 transfectada o no con el gen E6 o una variante del VPH18 demuestran que la producción de VEGF es regulada en mayor o menor grado por las hormonas esteroideas estradiol y progesterona así como sus antagonistas.

Interesantemente, en este modelo de expresión de una oncoproteína del VPH18 los efectos, particularmente del estradiol y la progesterona son mayores en las líneas que expresan la oncoproteína viral lo cual puede ser explicado por la potenciación del efecto de las hormonas sobre la expresión de VEGF.

El papel potenciador sobre la expresión de VEGF de E6 es demostrado por el efecto inhibitorio que la progesterona tiene sobre la línea MCF7 y como el efecto se convierte en estimulador cuando la línea MCF7 expresa la oncoproteína viral.

Por otra parte, aunque el efecto no es tan consistente, los antagonistas ICI 182.780 y RU480 tienden a disminuir la expresión de VEGF a pesar de que las células sean cultivadas en un medio libre de esteroides lo cual puede ser explicado por el bloqueo de una actividad estrogénica y progestágena endógena mínima mediada o no directamente por sus receptores.

El efecto diferenciado y variable en relación al tiempo de la línea MCF7 con la variante de E6 mas probablemente se debe a variación clonal ya que en otros modelos esta variante exhibe menos efectos oncogénicos que la proteína E6 de la clona HPV18 de referencia.

Finalmente, los hallazgos estimuladores del estradiol sobre las dos líneas de cáncer de cervix utilizadas, CasKi (VPH+) y C33 (VPH-) que expresan y no receptores hormonales respectivamente sugieren que en el cáncer de cervix, el ICI-182.780 podría tener un efecto terapéutico al disminuir la expresión de VEGF.

BIBLIOGRAFIA

Abulafia O, Triests WE, Sherer DM. ANGIOGENESIS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN SITU AND MICROINVASIVE CARCINOMA OF THE UTERINE CERVIX. *Obstet Gynecol* 1996; 88:927-932.

Bernard HU, Chan SY, Manos MM, Ong CK, Villa LL, Delius H, Peyton CL, Bauer HM, Wheeler CM. A IDENTIFICATION AND ASSESMENT OF KNOWN AND NOVEL HUMAN PAPILOMAVIRUSES BY POLIMERASE CHAIN REACTION AMPLIFICATION, RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISMS, NUCLEOTIDE SEQUENCE, AND PHYLOGENETIC ALGORITHMS. *J Infect Dis* 1994;170:1077-1085.

Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR. VASCULAR PERMEABILITY FACTOR (VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR) GENE IS EXXPRESSED DIFFERENTIALLY IN NORMAL TISSUES, MACROPHAGES AND TUMORS. *Moll Biol Cell* 1992; 3:211-220.

Bouk N, Stellmach V, Hsu SC. HOW TUMORS BECOME ANGIOGENIC. *AdvCancer Res* 1996; 69: 136-174.

Brady CS, Duggan-Keen MF, Davidson JA, Varley JM, Stern PL. HUMAN PAPILOMAVIRUS TYPE 16 E6 VARIANTS IN CERVICAL CARCINOMA: REALTIONSHIP TO HOST GENETIC FACTOR AND CLINICAL PARAMETERS. *J Gen Virol* 1999; 80: 3233-3240.

Burk RD, Masanori LT, Gavitt PE, Brinton LA, Kurman RJ, Barnes WA, Greenberg MD, Hadjimichael OC, Fu L, McGowan L, Rodriguez M, Schwartz PE, Hildesheim1 A. DISTRIBUTION OF HUMAN PAPILOMAVIRUS TYPES 16 AND 18 VARIANTS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMAS AND ADENOCARCINOMAS OF THE CERVIX *Cancer Res* 2003;63:7215-7220.

Chan WK, Gloss B, Bernard HU. HUMAN PAPILOMAVIRUS 16 AND GENITAL CANCER: ARE TESTS FOR THE VIRAL GENE EXPRESSION IN VITRO INDICATORS FOR RISK FACTORS IN VIVO? *Ann Acad Singapore* 1998; 17:232-237.

Chang C, Chen T, Hsu P, Yang J, Hwang G. THE PREVALENCE OF HPV-18 AND VARIANTS OF E6 GENE ISOLATED FROM CERVICAL CANCER PATIENTS IN TAIWAN. *J Clin Virol* 2005,; 32: 33-37.

Cantu De Leon D, Lopez-Graniel C, Frias Mendivil M, Chanona Vilchis G, Gomez C, De La Garza Salazar J. SIGNIFICANCE OF MICROVASCULAR DENSITY IN CERVICAL CANCER RECURRENCE. *Int J Gynecol Cancer* 2003;13: 864—870.

Chodak GW, Haudenschild C, Gittes RF, Folkman J. ANGIOGENIC ACTIVITY AS A MARKER OF NEOPLASTIC AND PRENEOPLASTIC LESIONS OF THE HUMAN BLADDER. *Ann Surg* 1980;192:762–771.

Cullinan-Bove K, Joos RD. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR / VASCULAR PERMEABILITY FACTOR EXPRESSION IN THE RAT UTERUS: RAPID STIMULATION BY ESTROGEN CORRELATES WITH ESTROGEN-INDUCED INCREASES IN UTERINE CAPILLARY PERMEABILITY AND GROWTH. *Endocrinology* 1993; 133: 829-837.

Dellas A, Moch H, Schultheiss E, Feichter G, Almendral AC, Gudat F, Torhorst J. ANGIOGENESIS IN CERVICAL NEOPLASIA : MICROVESSEL QUANTITATION IN PRECANCEROUS LESIONS AND INVASIVE CARCINOMA WITH CLINICOPATHOLOGICAL CORRELATIONS. *Gynecol Oncol* 1997;67: 27 – 33.

De Vita VT. CANCER PRINCIPLES AND PRACTICE OF ONCOLOGY. 5a Edición, Lippincott, USA 1997. pp:135-139

DiMaio D. TRANSFORMING ACTIVITY OF BOVINE AND HUMAN PAPILOMAVIRUS IN CULTURED CELLS. *Adv Cancer Res* 1991;56:133-159.

Disaia PJ, Creasman WT. CLINICAL GYNECOLOGIC ONCOLOGY, 5a. edition, ed. Harcourt Brace, USA 1999. pp:51-106.

Dobbs SP, Hewett PW, Johnson IR, Carmitcheael J, Murray JC. ANGIOGENESIS IS ASSOCIATED WITH VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION IN CERVICAL INTRAEPITHELIAL NEOPLASIA. *Br J Cancer* 1977; 76:1410-1415.

Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. REVIEW : VASCULAR PERMEABILITY FACTOR / VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR, MICROVASCULAR HYPERPERMEABILITY, AND ANGIOGENESIS. *Am J Pathol* 1995;146:1029 – 1039.

Ellis JRM, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS, et al. THE ASSOCIATION OF AN HPV-16 ONCOGENE VARIANT WITH HLA-B7 HAS IMPLICATIONS FOR VACCINE DESIGN IN CERVICAL CANCER. *Nature Med* 1995;1:464-470.

Ellis PA, Saccani-Jotti G, Clarke R, Johnston SR, Anderson E, Howell A, A'Hern R, Salter J, Detre S, Nicholson R, Robertson J, Smith IE, Dowsett M. INDUCTION OF APOPTOSIS BY TAMOXIFEN AND ICI 182,780 IN PRIMARY BREAST CANCER. *Int J Cancer* 1997;72:608-613.

Fawell SE, White R, Hoare S, Sydenham M, Page M, Parker MG. INHIBITION OF ESTROGEN RECEPTOR-DNA BINDING BY THE "PURE" ANTIESTROGEN ICI 164,384 APPEARS TO BE MEDIATED BY IMPAIRED RECEPTOR DIMERIZATION. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:6883-6887.

Ferrara N. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR: BASIC SCIENCE AND CLINICAL PROGRESS. *Endocr Rev* 2004; 25:581-611

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Millan KJ, Moore MW. HETEROZYGOUS EMBRYONIC LETHALITY INDUCED BY TARGETED INACTIVATION OF THE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR GENE. *Nature (Lond.)* 1996; 380: 439 – 442.

Folkman J. WHAT IS THE EVIDENCE THAT TUMORS ARE ANGIOGENESIS DEPENDENT. *N Engl J Med* 1990;285:82 – 86.

Folkman J. CLINICAL APPLICATIONS OF RESEARCH ON ANGIOGENESIS. *N Engl J Med* 1995;333:1757–63.

Franco E, Villa LL, Rahal P, Ruiz A. MOLECULAR VARIANT ANALYSIS AS AN EPIDEMIOLOGICAL TOOL TO STUDY PERSISTENCE OF CERVICAL HUMAN PAPILOMAVIRUS INFECTION. *J Nat Cancer Inst* 1994; 86:1558-1559.

Ganong WF. FISILOGIA MEDICA. 13a Edición. Ed. El Manual Moderno. México.1992. pp 39, 40, 370-372, 402, 403.

Hanahan D, Folkman J. PATTERNS AND EMERGING MECHANISMS OF THE ANGIOGENIC SWITCH DURING TUMORIGENESIS. *Cell* 1996; 86:353-364.

Hanahan D, Weinberg RA. THE HALLMARKS OF CANCER. *Cell* 2000; 100: 57-70.

Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD. GENETIC CHARACTERIZATION OF THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) 18 E2 GENE IN CLINICAL SPECIMENS SUGGESTS THE PRESENCE OF A SUBTYPE WITH DECREASES ONCOGENIC POTENTIAL *Int J Cancer.* 1995; 60:369-376.

Hildesheim A, Schiffman M, Bromley C, Wacholder S, Herrero R, Rodriguez A, Bratti MC, Sherman ME, Scarpidis U, Lin QQ, Terai M, Bromley RL, Buetow K, Apple RJ, Burk RD. HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 VARIANTS AND RISK OF CERVICAL CANCER. *J Natl Cancer Inst* 2001; 91: 315-318.

Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K, Harris AL. ANGIOGENESIS ASSESSED BY PLATELET / ENDOTHELIAL CELL ADHESION MOLECULE ANTIBODIES, AS AN INDICATOR OF NODE METASTASIS AND SURVIVAL IN BREAST CANCER. *Lancet* 1992;340:1120-1124.

Hyder SM, Chiappetta C, Stancel GM. SYNTHETIC ESTROGEN 17 A-ETHINYL ESTRADIOL INDUCES PATTERN OF UTERINE GENE EXPRESSION SIMILAR TO ENDOGENOUS ESTROGEN 17 B-ESTRADIOL. *J Pharmacol exp ther* 1999; 290: 740-747.

Hyder SM, Chiappetta C, Stancel GM. PHARMACOLOGICAL AND ENDOGENOUS PROGESTINS INDUCE VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION IN HUMAN BREAST CANCER CELLS. *Int J Cancer* 2001; 92:469-473.

Hyder SM, Huang J, Nawaz Z, Boettger-Tong H, Mäkela S, Chiappetta C, Stance GM. REGULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR EXPRESSION BY ESTROGENS AND PROGESTINS. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 785-790.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

Hyder SM, Murthy L, Stancel G. PROGESTIN REGULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN HUMAN BREAST CANCER CELLS. *Cancer Research* 1998;58:392-395.

Jensen J, Kitlen JW, Briand P, Labrie F, Lykkesfeldt AE. EFFECT OF ANTIESTROGENS AND AROMATASE INHIBITOR ON BASAL GROWTH OF THE HUMAN BREAST CANCER CELL LINE MCF-7 IN SERUM-FREE MEDIUM. *J Steroid Biochem* 2003; 84: 469-478.

Kämmer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM, Pfister H. SEQUENCE ANALYSIS OF THE LONG CONTROL REGION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 VARIANTS AND FUNCTIONAL CONSEQUENCES FOR P97 PROMOTER ACTIVITY. *J Gen Virol.* 2000; 81:1975-1981.

Karuri AR, Kumar AM, Mukhopadhyay D. DIFFERENTIAL EXPRESSION AND SELECTIVE LOCALIZATION OF VASCULAR PERMEABILITY FACTOR/ VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN THE RAT UTERUS DURING THE ESTROUS CYCLE. *J Endocrinol* 1998; 159: 489-499.

Kim CJ, Um SJ, Kim TY, Kim EJ, Park TC, Kim SJ, NamKoong SE, Park JJ. REGULATION OF CELL GROWTH AND HPV GENES BY EXOGENOUS ESTROGENS IN CERVICAL CANCER CELLS. *Int J Gynecol Cancer* 2000;10:157-164.

Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. TELOMERASE ACTIVATION BY THE E6 GENE PRODUCT OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16. *Nature* 1996;380:79-82.

Lacey JV jr, Brinton LA, Barnes WA, Gravitt E, Greenberg MD, Hadjimichael OC, McGowan L, Mortel R, Schwartz PE, Kurman RJ, Hildesheim A. USE OF HORMONE REPLACEMENT THERAPY AND ADENOCARCINOMA AND SQUAMOUS CELL CARCINOMAS OF THE UTERINE CERVIX. *Gynecol Oncol* 2000; 77:149-154.

Lizano SM, García-Carrancá A. LAS VARIANTES MOLECULARES DE PAPILOMA VIRUS HUMANOS TIPO 16, 18 Y 45 EN TUMORES DEL CUELLO UTERINO EN MEXICO. *Gac Med Mec* 1996;133:43-48.

Michelin D, Gissmann L, Street D, Potkul RK, Fisher S, Kaufmann AM, Qiao L, Schreckenberger C. REGULATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 IN VIVO: EFFECTS OF ESTROGEN AND PROGESTERONE IN TRANSGENIC MICE. *Gynecol Oncol* 1997; 66: 202-208.

Moon HS, Kim SC, Ahn JJ, Woo H, Woo BH. CONCENTRATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) AND TRANSFORMING GROWTH FACTOR-B1 (TGF-B1) IN THE SERUM OF PATIENTS WITH CERVICAL CANCER. PREDICTION OF RESPONSE. *Int J Gynecol Cancer* 2000;10:151-156.

Morales-Peza N, Auewarakul P, Juárez V, García-Carrancá A, Cid-Arregui A. IN VIVO TISSUE-SPECIFIC REGULATION OF THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 18 EARLY PROMOTER BY ESTROGEN, PROGESTERONE, AND THEIR ANTAGONISTS. *Virology* 2002;294:135-140.

Munger K, Howley PM. HUMAN PAPILLOMAVIRUS IMMORTALIZATION AND TRANSFORMATION FUNCTIONS. *Virus Res* 2002; 89: 213-228.

Nakamura J, Savinov A, Lu Q, Brodie A. ESTROGEN REGULATES VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH PERMEABILITY FACTOR EXPRESSION IN 7-12-DIMETHYLBENZ(A)ANTHRACENE-INDUCED RAT MAMMARY TUMOURS. *Endocrinology* 1996;137:5589-5596.

Nawas Z, Stancel GM, Hyder SM. THE PURE ANTIESTROGEN ICI 182,780 INHIBITS PROGESTIN-INDUCED TRANSCRIPTION. *Cancer Res* 1999; 59:372-376.

Nevins JR. TRANSCRIPTIONAL REGULATION: A CLOSER LOOK AT E2F. *Nature* 1991;358:375-376.

Obermair A, Wanner C, Bilgi S, Speiser P, Kaider A, Reinthaller A, Leodolter S, Gitsch G. TUMOR ANGIOGENESIS IN STAGE IB CERVICAL CANCER : CORRELATION OF MICROVESSEL DENSITY WITH SURVIVAL. *Am J Obstet Gynecol* 1998;178:314-319.

Osborne CK, Coronado-Heinsohn EB, Hilsenbeck SG, McCue BL, Wakeling AE, McClelland RA, Manning DL, Nicholson RI. COMPARISON OF THE EFFECTS OF A PURE STEROIDAL ANTIESTROGEN WITH THOSE OF TAMOXIFEN IN A MODEL OF HUMAN BREAST CANCER. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:746-750.

Osborne CK, Shao H, Fuqua SAW. SELECTIVE ESTROGEN RECEPTOR MODULATORS : STRUCTURE, FUNCTION, AND CLINICAL USE. *J Clin Oncol* 2000; 18:3172-3186.

Okada F, Rak JW, Croix B, Lieubreau B, Kaya M, Roncari L, Shirakawa S, Sasazuki T, Kerbel RS. IMPACT OF ONCOGENES IN TUMOR ANGIOGENESIS: MUTANT K-RAS UP-REGULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR / VASCULAR PERMEABILITY FACTOR IS NECESSARY, BUT NOT SUFFICIENT FOR TUMORIGENICITY OF HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELLS. *Proc Natl Acad Sci* 1998; 95:3609 – 3614

Pagano M, Dürst M, Joswig S, Draetta G, Jansen-Dürr P. BINDING OF THE HUMAN E2F TRANSCRIPTION FACTOR TO THE RETINOBLASTOMA PROTEIN BUT NOT TO CYCLIN a IS ABOLISHED IN HPV-16-IMMORTALIZED CELLS. *Oncogene* 1992;7:1681 – 1686.

Pater A, Bayatpour N, Pater N. ONCOGENIC TRANSFORMATION BY HUMAN PAPILLOMAVIRUS TYPE 16 DEOXYRIBONUCLEIC ACID IN THE PRESENCE OF PROGESTERONE OR PROGESTINS FROM ORAL CONTRACEPTIVES. *Am J Obstet Gynecol* 1990;162:1099-1103.

Rak J, Mitsuhashi Y, Sheehan C, Tamir A, Vilorio-Petit A, Filmus J, Mansour SJ, ahn NG, Kerbel RS. ONCOGENES AND TUMOR ANGIOGENESIS : DIFFERENTIAL MODES OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR UP-REGULATION IN RAS-TRANSFORMED EPITHELIAL CELLS AND FIBROBLASTS. *Cancer Res* 2000;60:490 – 498.

REGISTRO HISTOPATOLOGICO DE LAS NEOPLASIAS EN MEXICO. SSA, 1997.

Rojas-Espaillet LA, Rose PG. MANAGEMENT OF LOCALLY ADVANCED CERVICAL CANCER. *Curr Opin Oncol* 2005; 17: 485-492.

Ruohola JK, Valve EM, Karkkainen MJ, Joukov V Alitalo K, Härkönen PL. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR ARE DIFFERENTIALLY REGULATED BY STEROID HORMONES AND ANTIESTROGENS IN BREAST CANCER CELLS. *Mol Cell Endocrinol* 1999; 149:29-40

Schlenger K, Höckel M, Mitze M, Schaffer U, Weikel W, Knapstein PG, Lambert A. TUMOR VASCULARITY – A NOVEL PROGNOSTIC FACTOR IN ADVANCED CERVICAL CARCINOMA. *Gynecol Oncol* 1995;59:57–66.

Shi YP, Ferrara N. ONCOGENIC RAS FAILS TO RESTORE AN *IN VIVO* TUMORIGENIC PHENOTYPE IN EMBRYONIC STEM CELLS LACKING VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF). *Biochem Biophys res Commun* 1999;254:480–483.

Shirfren JL, Tseng JF, Zaloudek CJ, Ryan IP, Meng YG, Ferrara N, Jaffe RB, Taylor RN. OVARIAN STEROID REGULATION OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR IN THE HUMAN ENDOMETRIUM: IMPLICATIONS FOR ANGIOGENESIS DURING THE MENSTRUAL CYCLE AND IN THE PATHOGENESIS OF ENDOMETRIOSIS. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 185: 402-408.

Smith-McCune KK, Weidner N. DEMONSTRATION AND CHARACTERIZATION OF THE ANGIOGENIC PROPERTIES OF CERVICAL DYSPLASIA. *Cancer Res* 1994;54:800-804.

Srivastava A, Laidler P, Daures RP, David RP, Horgan K, Hughes LE. THE PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF TUMOR VASCULARITY IN INTERMEDIATE THICKNESS (0.76 – 4.0 MM THICK) SKIN MELANOMA : A CUANTITATIVE HISTOLOGIS STUDY. *Am J Pathol* 1998;133:419–23.

Stafl A, Mattingly RF. ANGIOGENESIS OF CERVICAL NEOPLASIA. *Am J Obstet Gynecol* 1975; 121:845-852.

Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. NATURAL VARIANTS OF THE HUMAN PAPILLOMAVIRUS E6 PROTEIN DIFFER IN THEIR ABILITIES TO ALTER KERATINOCYTE DIFFERENTIATION AND TO INDUCE P53 DEGRADATION. *J Virol* 1996;70:6987-6993.

Sup Park J, Woong J, Joo C, Sook H, Young S, Ill Y, Eun S, Sig H, Jong S. NEOPLASTIC CANGE OF SQUAMO-COLUMNAR JUNCTION IN UTERINE CERVIX AND VAGINAL EPITHELIUM BY EXOGENOUS ESTROGEN IN HPV-18 URR E6/E7 TRANGENIC MICE. *Gyencol Oncol* 2003;89:360-368.

Suzuki Y, Nakano T, Arai T, Morita S, Tsujii H, Oka K. PROGESTERONE RECEPTOR IS A FAVORABLE PROGNOSTIC FACTOR OF RADIATION THERAPY FOR ADENOCARCINOMA OF THE UTERINE CERVIX. *Intr J Radiation Oncology Biol Phys* 2000; 47: 1229-1234.

Toussaint-Smith E, Donner DB, Roman A. EXPRESSION OF HUMAN PAPILOMAVIRUS TYPE 16 E6 AND E7 ONCOPROTEINS IN PRIMARY FORESKIN KERATINOCYTES IS SUFFICIENT TO ALTER THE EXPRESSION OF ANGIOGENIC FACTORS. *Oncogene* 2004; 23:2988-2995.

Turek LP, Smith EM. THE GENETIC PROGRAM OF GENITAL HUMAN PAPILOMAVIRUSES IN INFECTION AND CANCER. *Obstet Gynecol Clin NA* 1996;23:735-758.

Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. MOLECULAR VARIANTS OF HUMAN PAPILOMAVIRUS TYPES 16 AND 18 PREFERENTIALLY ASSOCIATED WITH CERVICAL NEOPLASIA. *J Gen Virol* 2000; 81:2959-2968.

Von Knebel Doeberitz M, Rittmüller C, Aengeneyndt F, Jansen-Dürr P, Spitkousky D. REVERSIBLE REPRESSION OF PAPILOMAVIRUS ONCOGENE EXPRESSION IN CERVICAL CARCINOMA CELLS : CONSEQUENCES FOR THE PHENOTYPE AND E6-p53 AND E7-pRB INTERACTIONS. *J Virol* 1994;68:2811 – 2821.

Wakeling AE. THE FUTURE OF NEW PURE ANTIESTROGEN IN CLINICAL BREAST CANCER. *Breast Cancer Res Treat* 1993;25:1-9.

Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akigama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S, Ushigorre S. TUMOR ANGIOGENESIS IN PROSTATIC CARCINOMA WITH AND WITHOUT BONE METASTASIS: A MORPHOMETRIC STUDY. *J Pathol* 1992;168:257–262.

Warren BA, Shubik P. THE GROWTH OF THE BOOLD SUPPLY TO MELANOMA. *Lab Invest* 1966;15:464 – 470.

Watson JD, Hopkins NH. MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE. 4a Edición, The Benjamin Cummings Publishing Inc., USA 1994. pp 865-867.

Webster K, Taylor A, Gaston K. OESTROGEN AND PROGESTERONE INCREASE THE LEVELS OF APOPTOSIS INDUCED BY THE HUMAN PAPILOMAVIRUS TYPE 16 E2 AND E7 PROTEINS. *J Genl Virol* 2001;82:201-213.

Weidner N, Semple JP, Welch WK, Folkman J. TUMOR ANGIOGENESIS AND METASTASIS – CORRELATION IN INVASIVE BREAST CARCINOMA. *N Engl J Med* 1991;324:1-8.

Wiggins DL, Granal CO, Steinhoff MM, Calabresi P. TUMOR ANGIOGENESIS AS A PROGNOSTIC FACTOR IN CERVICAL CARCINOMA. *Gynecol Oncol* 1995;56:353-356.

Xi LF, Demers W, Koutsky LA, Kiviat NB, Kuypers J, Watts DH, Holmes KK, Galloway DA. ANALYSIS OF HUMAN PAPILOMAVIRUS TYPE 16 VARIANTS INDICATES ESTABLISHMENT OF PERSISTENT INFECTION. *J Infect Dis* 1995;172:747-755.