



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**POLIMORFISMO DEL ADN MITOCONDRIAL  
HUMANO ASOCIADO A LOS VIRUS DEL  
PAPILOMA HUMANO EN CÁNCER DE  
CERVIX.**

T E S I S:

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

**INGRID YASBETH MEDINA MARTÍNEZ**



**MÉXICO DF, 2007**



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.

## **Agradecimientos**

Gracias a mis padres por apoyarme siempre y exigirme ser mejor que el día anterior.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, por la grandiosa oportunidad de ser parte de la máxima casa de estudios, es un orgullo ser parte de esta institución.

Gracias a la honorable Facultad de Química, por la excelente formación académica y moral que aprendí durante toda mi carrera.

Gracias al Dr. Jaime Berumen Campos por la guía y el apoyo en el aprendizaje y desarrollo de mis capacidades.

Gracias al Hospital General de México por el apoyo en la realización de esta tesis.

Gracias a todos los profesores, maestros y personas que me iluminaron con su conocimiento.

## **Dedicatorias**

Dedico este trabajo a Dios por mostrarme siempre el camino, a mis padres Zuleika y José Luis por enseñarme que lo más valioso de cumplir las metas, es el sacrificio hecho para alcanzarlas, a mis hermanos, Zule, Ari y Uli por creer siempre en mí y hacerme tan dichosa, a Ethan y Joshua por iluminar mi vida.

Al amor de mi vida Víctor, por regalarme tu paciencia, por amarme, por confiar en mí, por ayudarme a alcanzar todos mis sueños y por permitirme pasar el resto de mi vida a tu lado. Te amo.

A Elena muchas gracias por tu inteligencia y maravillosa amistad, a Eli por enseñarme todo lo que se y ser mi amiga, a Mercedes por tu sabiduría y cariño sincero, a Mariano por todas las tardes de complicidad laboral y la amistad en Cristo.

A mis abuelitos en el cielo y a mi abuelita Ángeles, a todas mis tías y tíos, a mis primas y primos, en especial Iza, Pepe y Rodri, y a mis amigos por ayudarme a cumplir esta meta y darme siempre buenos consejos.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**POLIMORFISMO DEL ADN MITOCONDRIAL  
HUMANO ASOCIADO A LOS VIRUS DEL  
PAPILOMA HUMANO EN CÁNCER DE  
CERVIX.**

T E S I S:

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

P R E S E N T A:

**INGRID YASBETH MEDINA MARTÍNEZ**



**MÉXICO DF, 2007**

## **Agradecimientos**

Gracias a mis padres por apoyarme siempre y exigirme ser mejor que el día anterior.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México, por la grandiosa oportunidad de ser parte de la máxima casa de estudios, es un orgullo ser parte de esta institución.

Gracias a la honorable Facultad de Química, por la excelente formación académica y moral que aprendí durante toda mi carrera.

Gracias al Dr. Jaime Berumen Campos por la guía y el apoyo en el aprendizaje y desarrollo de mis capacidades.

Gracias al Hospital General de México por el apoyo en la realización de esta tesis.

Gracias a todos los profesores, maestros y personas que me iluminaron con su conocimiento.

## **Dedicatorias**

Dedico este trabajo a Dios por mostrarme siempre el camino, a mis padres Zuleika y José Luis por enseñarme que lo más valioso de cumplir las metas, es el sacrificio hecho para alcanzarlas, a mis hermanos, Zule, Ari y Uli por creer siempre en mí y hacerme tan dichosa, a Ethan y Joshua por iluminar mi vida.

Al amor de mi vida Víctor, por regalarme tu paciencia, por amarme, por confiar en mí, por ayudarme a alcanzar todos mis sueños y por permitirme pasar el resto de mi vida a tu lado. Te amo.

A Elena muchas gracias por tu inteligencia y maravillosa amistad, a Eli por enseñarme todo lo que se y ser mi amiga, a Mercedes por tu sabiduría y cariño sincero, a Mariano por todas las tardes de complicidad laboral y la amistad en Cristo.

A mis abuelitos en el cielo y a mi abuelita Ángeles, a todas mis tías y tíos, a mis primas y primos, en especial Iza, Pepe y Rodri, y a mis amigos por ayudarme a cumplir esta meta y darme siempre buenos consejos.

# ÍNDICE

## I. ANTECEDENTES

a) Virus del papiloma humano y Cáncer cervical.....	1
b) Virus del papiloma humano	
1. Taxonomía.....	2
2. Clasificación.....	5
3. Organización genómica.....	7
4. Patogenia.....	13
5. Factores de riesgo asociados a la infección por VPH y al desarrollo de cáncer cervical.....	18
c) ADN mitocondrial humano	
1. Descripción.....	20
2. Características del ADNm.....	20

<b>II: JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.....</b>	<b>23</b>
---	-----------

<b>III: OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
--	-----------

## IV: MATERIALES Y MÉTODOS

a) Recolección de muestras.....	25
b) Separación de linfocitos.....	25
c) Extracción del ADN.....	26
d) Amplificación por PCR.....	27
e) Purificación del ADN.....	30
f) Secuenciación.....	31
g) Análisis de las secuencias.....	32
h) Diagrama de flujo general.....	34

## **V. RESULTADOS**

a) Detección y tipificación del VPH.....	35
b) Polimorfismo del ADNm.....	36
c) Asociación de haplotipos mitocondriales y los tipos de VPH .....	41

## **VI. DISCUSIÓN**

a) Haplotipos mitocondriales.....	44
b) Asociación del polimorfismo mitocondrial y los tipos de VPH.....	46
c) Detección y tipificación del VPH.....	47
d) Perspectivas.....	49

## **VII. CONCLUSIONES.....50**

## **VIII. BIBLIOGRAFÍA.....52**

## **IX. ABREVIATURAS.....59**

## **X. GLOSARIO.....60**

## I. ANTECEDENTES

### VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CÁNCER CERVICAL

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda neoplasia más común a nivel mundial, tiene una incidencia de medio millón de casos nuevos cada año. Este tipo de cáncer se presenta con mayor frecuencia en países en desarrollo (Ver figura 1) (Harro et al, 2001); y en México es la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres, presentando una incidencia de 44 casos por 100,000 mujeres (Lazcano-Ponce et al, 2001).

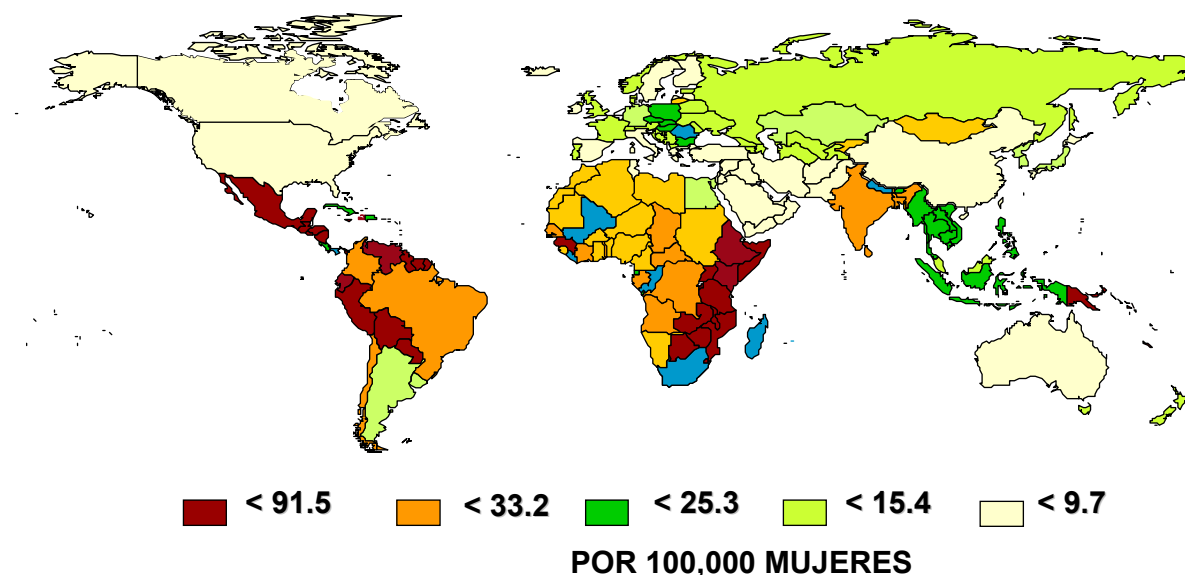


Fig. 1: Distribución de mujeres con cáncer cervical en el mundo. (Globocan 2002, IARC)

La correlación entre la infección genital del virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer cervical fue documentada por primera vez a principios de los años 80 por Harold zur Hausen y se ha demostrado que existe un rol etiológico por la infección con algunos tipos del virus del papiloma humano (Franco et al, 2003). El VPH se ha encontrado como un factor fuertemente ligado al cáncer cervical invasivo, encontrándose hasta en un 99.7% de todos los casos de cáncer cervical escamoso (Walboomers et al, 1999).



La infección con VPH es una enfermedad de transmisión sexual muy común y se sugiere como la enfermedad viral de transmisión sexual más frecuente en el mundo. (Woon-Won et al, 2004). Por la asociación estricta entre el VPH y el cáncer cervical es necesario el estudio de este virus a fondo.

## VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

### Taxonomía

Originalmente los virus del papiloma (VP) estaban agrupados dentro de la familia *Papovaviridae* basado en la cápside no envuelta y en que el material genético es DNA de doble cadena, posteriormente al analizar el tamaño y la organización de los genomas de los virus de esta familia, el Comité Internacional de Taxonomía viral (ICTV) reconoció a los VP como miembros de la familia *Papillomaviridae*.

Los virus del papiloma tienen un diámetro de aproximadamente 55 nm, con cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros, cada uno es un pentámero de la proteína mayor de la cápside L1 (Ver figura 2).



Fig. 2: Modelo de la estructura de la cápside del VPH 16 (Modis et al, 2002)

El genoma es una copia de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pb y se organiza en 3 regiones: 1) La región reguladora de 400 a 1000 pb, contiene al promotor p97 el cual regula la replicación del DNA controlando la transcripción, ésta región tiene sitios de unión a E2 y el origen de replicación.

2) La región temprana donde se encuentran los genes que codifican para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 las cuales están involucradas en la replicación viral y los procesos de oncogénesis.

3) La región tardía donde se encuentran los genes que codifican para las proteínas estructurales de la cápside viral L1 y L2. La descripción de la organización del genoma viral se estudiará a detalle más adelante.

El gen LI es la secuencia más conservada del virus por lo que se emplea para la identificación de los tipos virales, para definir la existencia de nuevos tipos o variantes virales es necesario clonar el genoma viral completo y secuenciar el gen LI. Un nuevo tipo viral se reconoce cuando difiere en un 10% del genoma, una diferencia del 2-10% determina un subtipo y una diferencia menor al 2% determina una clase (De Villiers et al, 2004).

La clasificación actual de los PV consta de 17 géneros:

Tabla 1:

<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Propiedades biológicas</b>
Alpha-PV	15	Lesiones en mucosa y piel en primates y humanos.
Beta-PV	5	Lesiones cutáneas en humanos, infecciones latentes susceptibles a inmunosupresiones.
Gamma-PV	5	Lesiones cutáneas en humanos.
Delta-PV	4	Inducen fibropapilomas en caballos.
Epsilon-PV	1	Lesiones cutáneas bovinas.
Zeta-PV	1	Lesiones cutáneas en caballos.
Eta-PV	1	Lesiones cutáneas en aves.
Theta-PV	1	Lesiones cutáneas en aves.
Iota-PV	1	Lesiones cutáneas en roedores.
Kappa-PV	2	Lesiones en mucosa y piel en conejos.
Lamda-PV	2	Lesiones benignas en mamíferos.
Mu-VP	2	Lesiones cutáneas en humanos.
Nu-PV	1	Lesiones cutáneas benignas y malignas en humanos.
Xi-PV	1	Lesiones cutáneas y en mucosa en bovinos.
Omikron-PV	1	Verruugas genitales en cetáceos.
Pi-PV	1	Lesiones en mucosa aislada de hamsters.

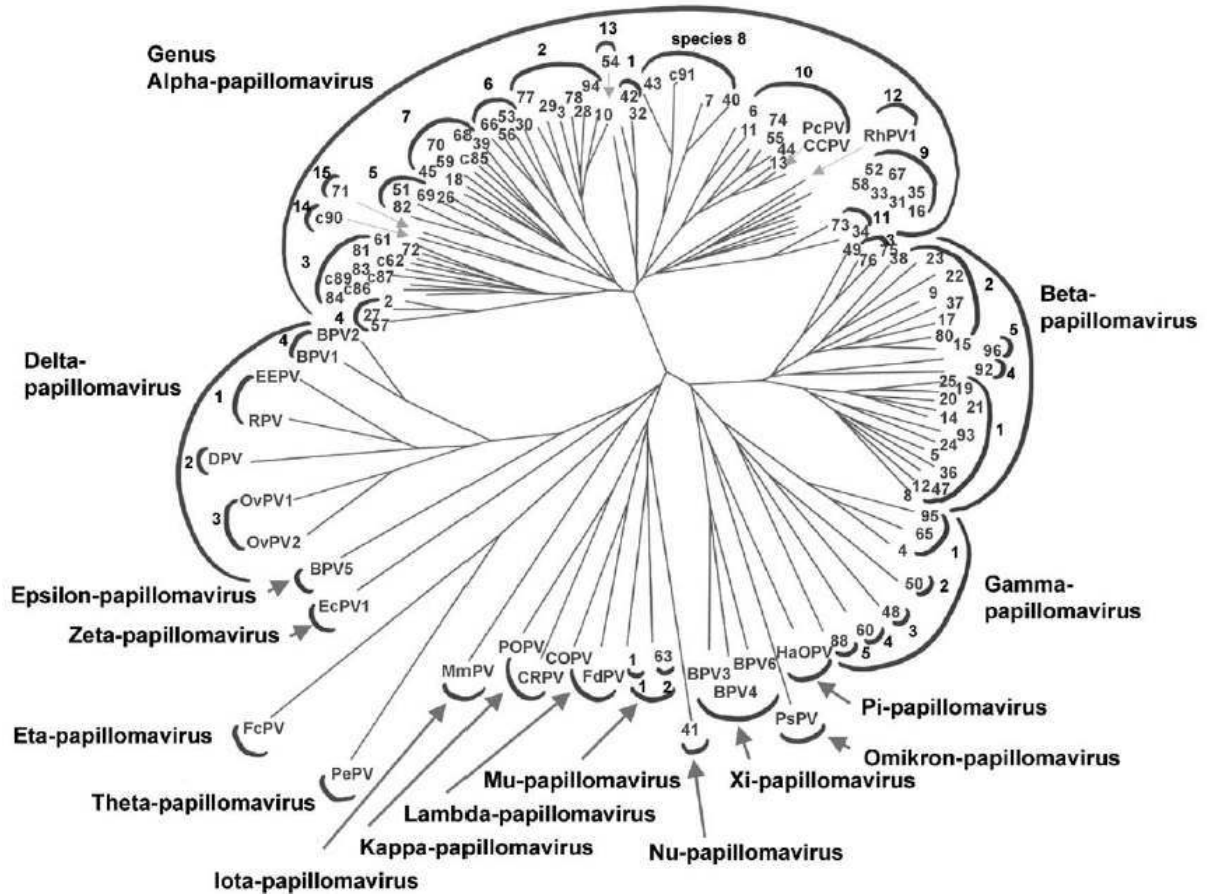


Fig. 3: Árbol filogenético de los Papillomavirus (De Villiers et al, 2004).

Debido a la similitud en la secuencia los VP del género alfa se agrupan en 15 familias, los tipos 18, 39, 45, 59, 68, 70 y c85 pertenecen a la especie 7; los tipos 16, 31, 33, 35, 52, 58 y 67 pertenecen a la especie 9, los tipos virales de bajo riesgo más frecuentes son el 6 y el 11, los cuales se agrupan en la especie 10.

## Clasificación

Los alfa-papillomavirus se han clasificado en virus de alto riesgo, que corresponden a los tipos virales asociados a procesos malignos, y de bajo riesgo, que son los tipos virales asociados a lesiones benignas.

Tabla 2: (Muñoz et al, 2003)

Virus de alto riesgo	Virus de bajo riesgo
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Los tipos virales 68, 73 y 82 se consideran de probable alto riesgo.

El VPH18 es el segundo tipo más frecuente en el mundo, encontrándose en un 20% de las infecciones por VPH, se ha demostrado que este tipo viral tiene una alta actividad transcripcional, lo que sugiere que es más agresivo que el VPH16 (Scheurer et al, 2005).

El VPH16 se encuentra en un 55% de las mujeres infectadas con algún tipo de papiloma (Muñoz et al, 2003), está altamente asociado a cáncer cervical invasivo, por ello la mayoría de los estudios para elucidar los mecanismos carcinogénicos se realizan enfocados en este tipo viral.

Los tipos virales son un conjunto de virus o variantes genéticas que difieren entre sí hasta en un 2% de su genoma, algunos de ellos se han asociado a lesiones más avanzadas o tipos histológicos más agresivos (Zehbel et al, 1998).

Las variantes virales del VPH16 se distribuyen de manera distinta en el mundo, las variantes Asiático-Americanas (AA) se encuentran principalmente en México, Centro y Sudamérica y España, las variantes africanas (Af) en África, las variantes asiáticas (As) en el sudeste de Asia y las variantes Europeas en todas las regiones excepto África (Yamada et al, 1997). Recientemente en México se descubrió la variedad Asiático-Americana compuesta por las subclases AA-a y AA-c del VPH16 (Casas et al, 1999). La variante AA se detecta en aproximadamente un 25% de las mujeres con CaCu de nuestro país, se ha demostrado que las mujeres que están infectadas con el VPH16 AA

tienen 27 veces más probabilidades de desarrollar cáncer cervical comparado con las mujeres negativas para este virus (Berumen et al, 2001).

Debido a su potencial oncogénico y a su alta frecuencia en nuestro país el estudio de estas variantes es sumamente importante.

Para la comprensión de los mecanismos oncogénicos virales es necesario el estudio del genoma viral, a continuación se hará una descripción de cada gen (Ver figura 4).

## Organización genómica

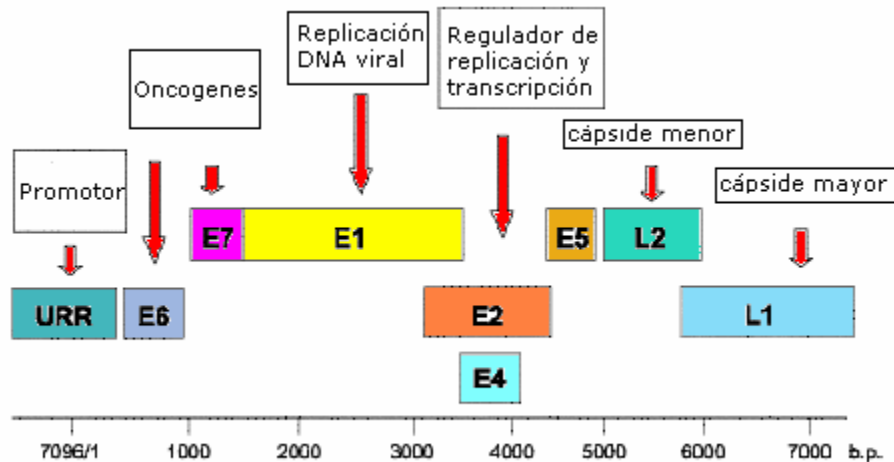


Fig. 4: Organización genómica del VPH

El gen E6 codifica para una oncoproteína de aproximadamente 16-19 KDa, de 151 aminoácidos. Se han descrito diversas funciones de la proteína E6 como su participación en la inmortalización celular, en efectos antiapoptóticos, en la desestabilización cromosomal y la activación de la telomerasa (Haussen, 2000). La proteína E6 de los tipos virales de alto riesgo se une a p53 para degradarla, este mecanismo es mediante la unión de la proteína E6 a una proteína celular de 100 kDa denominada proteína de asociación a E6 (E6-AP). El complejo E6-E6-AP interactúa con p53 y la degrada empleando la vía proteolítica dependiente de ubiquitina (Werness et al, 1990). La ubiquitinación de este supresor tumoral requiere las enzimas E1 (enzima activadora de la

ubiquitina) y E2 (enzima de conjugación de la ubiquitina) (Scheffner et al, 1993). En condiciones normales p53 induce la apoptosis y frena el ciclo celular en respuesta al estrés genotóxico y daño al DNA (Ver figura 5), por lo que si E6 degrada a p53, el ciclo celular se desregula y la célula se immortaliza (Ver figura 6).

La proteína E6 también se une a las siguientes proteínas:

- ERC55: Proteína con dominio de unión a calcio (Chen et al, 1995).
- hDlg: Proteína supresora de tumores de *D. melanogaster*. Homóloga humana (Kiyono et al, 1997).
- Paxilina: Proteína de adhesión focal involucrada en la traducción de señales de la membrana plasmática al citoesqueleto de actina (Tong y Hawley, 1997).
- Factor 3 regulador de interferón: Componente del complejo del factor de activación transcripcional viral (Ronco et al, 1998).
- Bak: Antagonista homólogo de bcl-2 y promotor de la apoptosis (Thomas y Banks, 1999).
- E6TPI: Proteína blanco de E6 (Gao et al, 1999).

El gen E7 codifica para la oncoproteína E7 de 10-14 kD, la cuál se une e inactiva a la forma hipofosforilada de la proteína de retinoblastoma (pRb) para degradarla por ubiquitinación (Dyson et al, 1989). La pRb es una proteína inhibidora que mantiene atrapado al factor de transcripción E2F, éste factor en conjunción con Hct1 y p27 impiden la progresión del ciclo celular al final de G1 (Ver figura 5). La unión entre E7 y pRb provoca la liberación de E2F estimulándose la expresión de genes involucrados en la síntesis del DNA y en la progresión de la fase G1 a la fase S (Foster et al, 1996), por lo que la proteína E7 está asociada a procesos de immortalización celular (Bandara et al, 1991) (Ver figura 6).

La proteína E7 de papilomavirus de alto riesgo forma complejos con las ciclinas A y E (Arroyo et al, 1993), estos complejos tienen una actividad cinasa que se asocia con procesos de transformación (Zerfass et al, 1995). E7 participa en la inducción de apoptosis dependiente de p53 (Puthenveetil et al, 1996); se ha observado que cuando

existen mutaciones en p53 la proteína E7 ejerce un efecto antiapoptótico (Magal et al, 1998). La proteína E7 promueve la integración del DNA viral al genoma celular, como resultado hay un incremento en los procesos de mutagénesis (Resnikoff et al, 1996). Otra función relevante de la proteína E7 es la inhibición de cinasas dependientes de ciclinas como p21<sup>CIP-1</sup> y p27<sup>KIP-1</sup>, lo cual estimula la proliferación de células infectadas (Zerfass-Thoma, 1996).



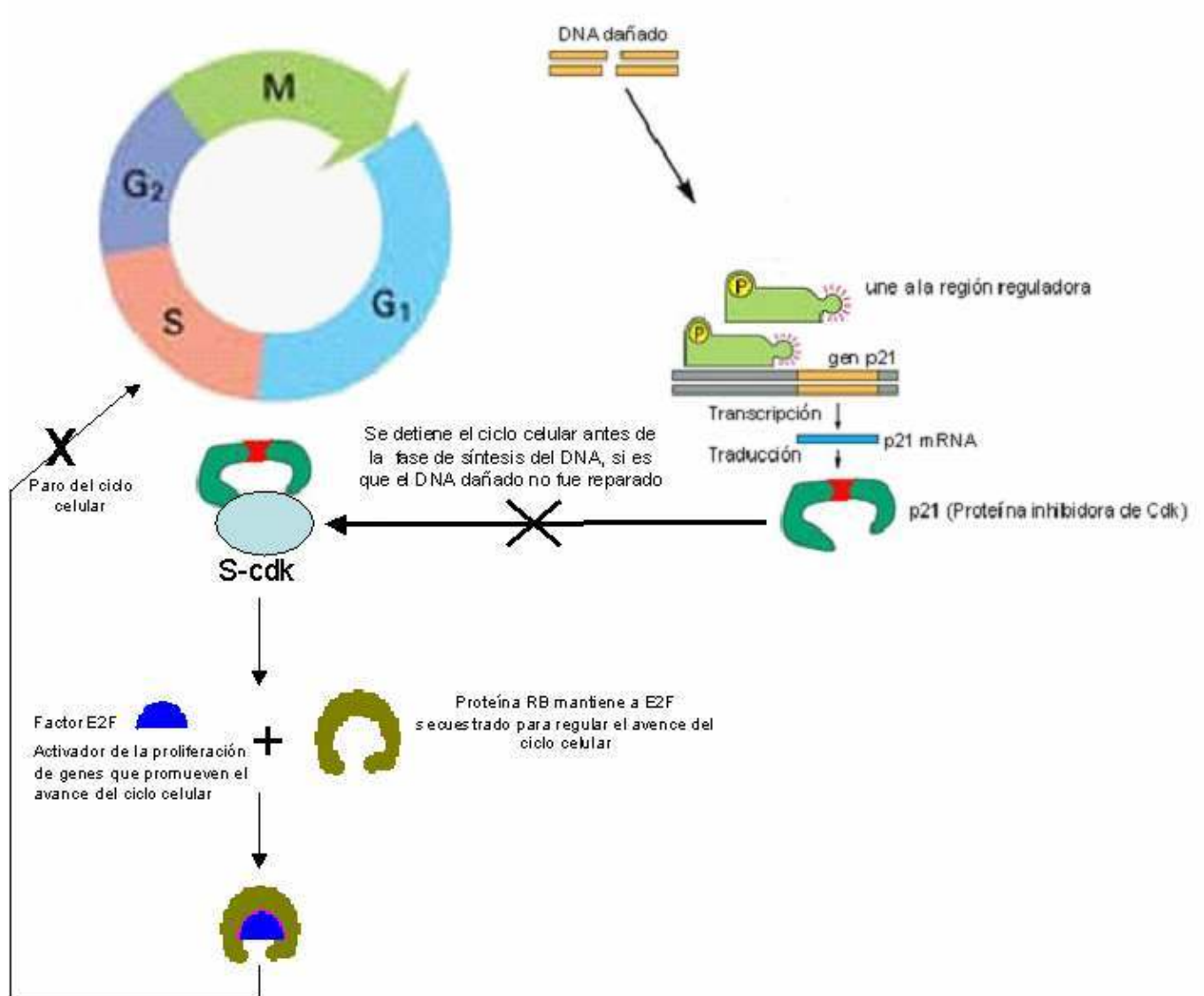


Fig 5: Funciones de p53 y pRB en una célula normal. En presencia de DNA dañado p53 actúa por medio de la proteína p21, para detener el ciclo celular antes de la síntesis de nuevo DNA, como el daño es irreparable la célula entra en apoptosis mediada por p53. En el caso de la proteína de retinoblastoma, la regulación en la progresión del ciclo celular es manteniendo atrapado a E2F, el cual es un activador de genes que participan en la progresión del ciclo. Tanto p53 como pRB regulan la progresión del ciclo celular.

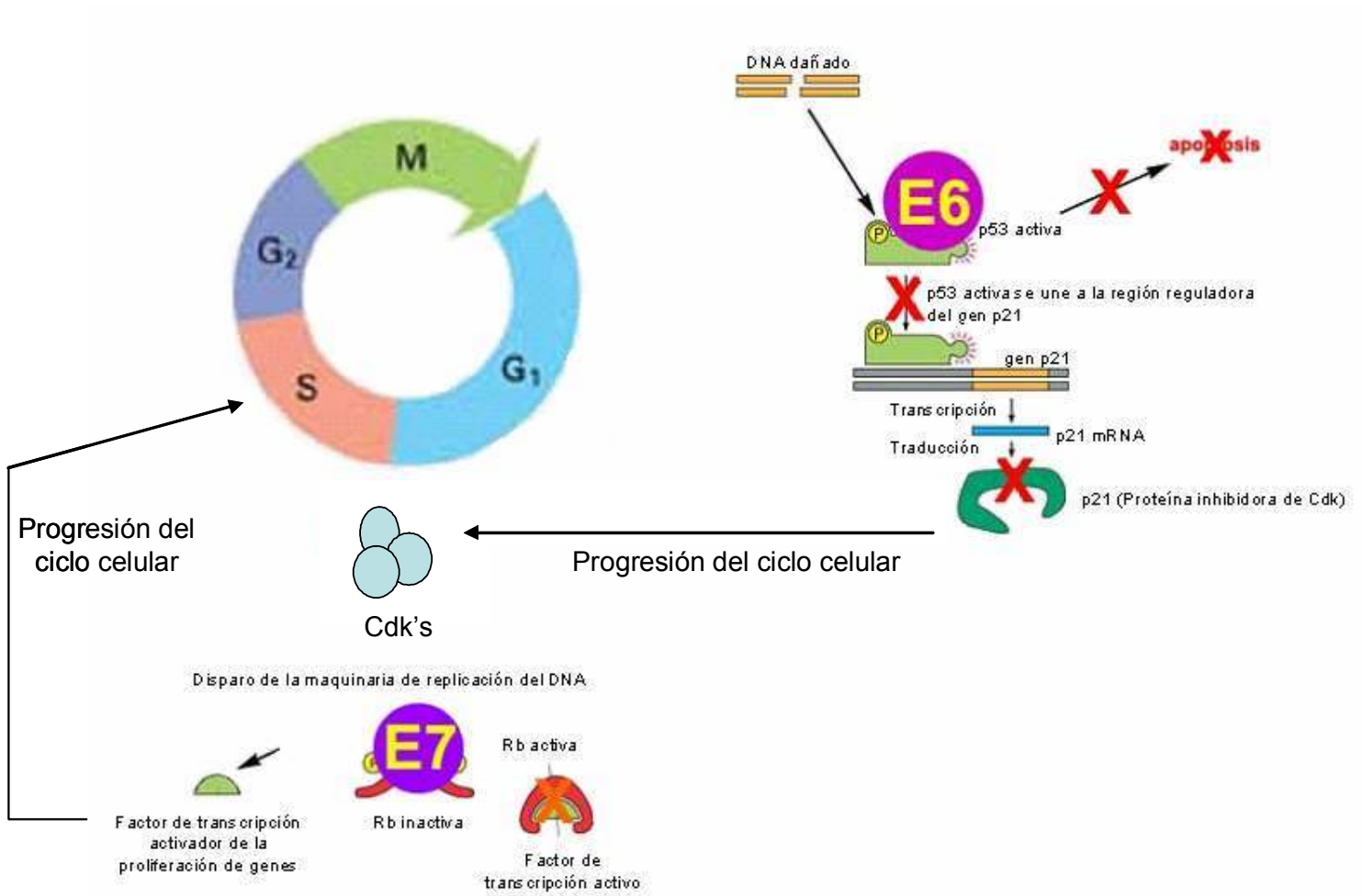


Fig 6. La oncoproteína E6 se une a p53 marcándola para degradarla empleando la vía proteolítica dependiente de ubiquitina, evitando que la célula se vaya a apoptosis, por otro lado la oncoproteína E7 se une a pRB, lo que resulta en la liberación del E2F y como consecuencia la progresión del ciclo celular.

El gen E1 codifica para la proteína más larga del virus (68-76 kD), la proteína E1 es una fosfoproteína nuclear esencial para la replicación del virus, E1 se une con baja afinidad al origen de replicación que se localiza dentro de LCR (Long Control Region). La función de la proteína E1 es la actividad de helicasa durante la replicación del DNA viral, y la interacción con la DNA polimerasa  $\alpha$  / primasa (Conger et al, 1999).

El gen E2 codifica para una proteína de unión de alta afinidad al DNA que reconoce la secuencia 5'AACCGN(4)CGGTT3' localizada en la LCR ( Dell et al, 2003), la proteína E2 de 45KDa se encarga de modular la transcripción y la replicación viral, esta proteína es un represor de la transcripción de genes tempranos. En la estructura cuaternaria de E2 existen tres dominios funcionales, el dominio de transactivación transcripcional N-terminal, la region de bisagra que es rica en prolinas y el dominio de unión a DNA C-terminal. (Graham et al, 2000) (Giri et al, 1988). Estudios *in vitro* han demostrado que el promotor de los oncogenes E6 y E7 es regulado por la proteína E2 (Sanders et al, 1994 ), cuando la proteína E2 se une a dicho promotor la transcripción de E6 y E7 se ve impedida por un efecto estérico. Durante la integración del genoma viral al genoma celular hay una ruptura de la región E1-E2, cuando esto sucede resulta en la perdida de la función de la proteína E2, ocasionando un descontrol en la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Kalantari et al, 1998).

El gen E4 codifica para una proteína que se expresa durante los procesos de desensamblaje de las partículas virales, también se ha involucrado en los procesos de transformación del genoma del huésped mediante desregulación de la vía de señalización mitogénica.

El gen E5 codifica para una proteína hidrofóbica que se encuentra normalmente en la membrana citoplasmática y en el aparato de Golgi. La proteína E5 forma complejos con otras proteínas transmembranales como el receptor del factor de crecimiento epidérmico, el receptor del factor  $\beta$  de crecimiento derivado de plaquetas y el receptor del factor de estimulación de colonias.

Se ha descrito que el marco abierto de lectura para E5 se modifica en células malignas, esto provoca la pérdida de la proteína E5 o una disminución en su expresión, estos eventos sugieren un rol importante de E5 durante la carcinogénesis cervical, pero no es indispensable durante la persistencia y la progresión del proceso maligno (Kim et al, 2006). Actualmente la contribución de E5 no está completamente entendida.

## Patogenia

El VPH puede inducir infecciones líticas, crónicas, latentes y de transformación dependiendo de la célula hospedera. Los VPH cutáneos infectan y se replican en el epitelio escamoso produciendo lesiones verrucoides. Los VPH de mucosa infectan y se replican en membranas de las mucosas genital, oral y conjuntiva induciendo proliferación epitelial (Faire et al, 1985).

La infección por VPH ocurre por transmisión sexual cuando el virus penetra a través de microlesiones o laceraciones en las células del epitelio basal. Las lesiones causadas por VPH epiteliotrópicos aparecen después de 4 a 6 semanas. Los tres tipos de epitelio escamoso (queratinizado, no queratinizado y metaplásico) son susceptibles a la infección viral.

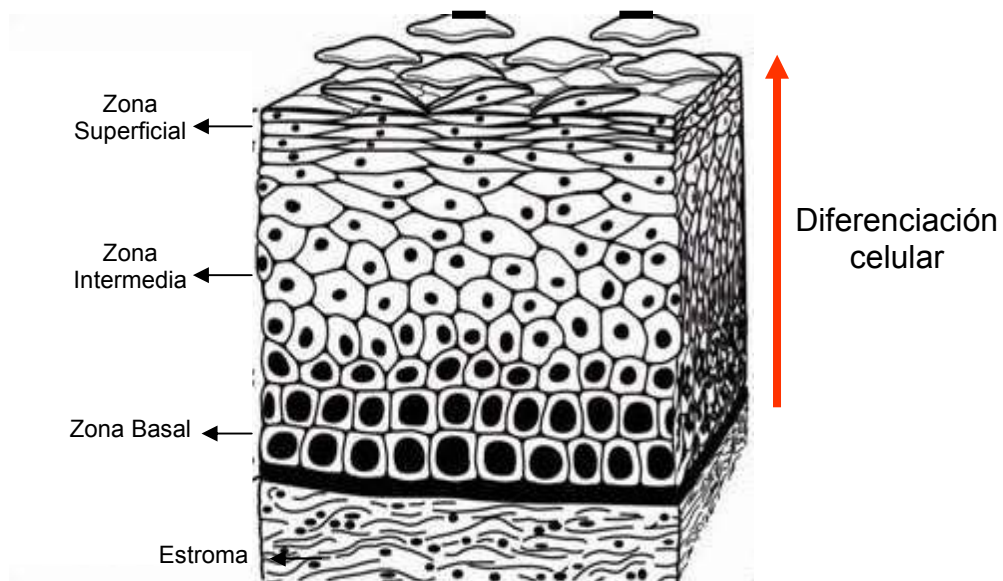
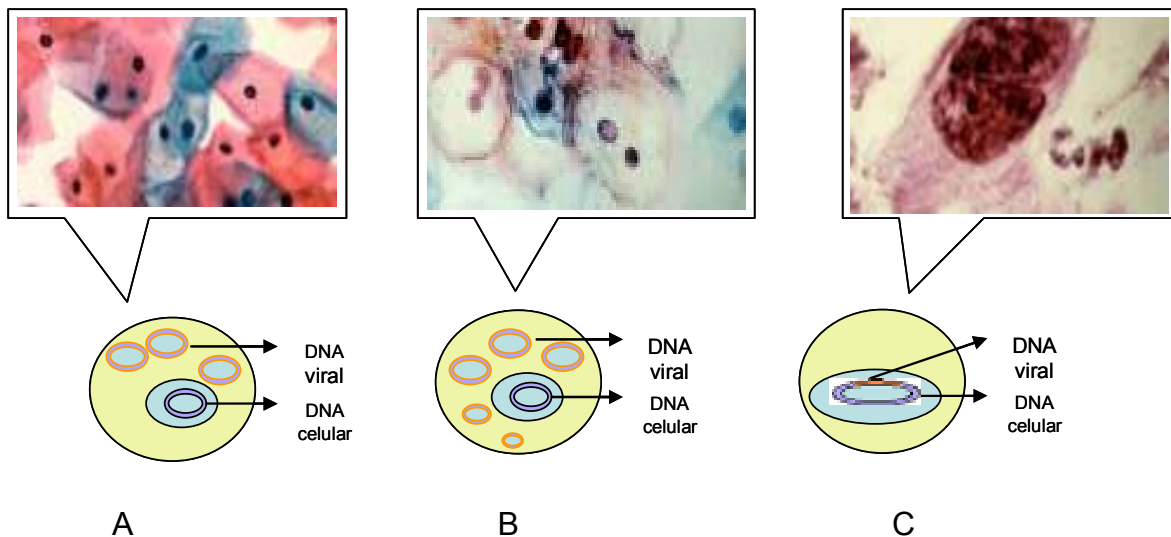


Figura 7: Estratos del epitelio escamoso

Las manifestaciones clínicas y morfológicas en el epitelio dependen del tipo viral que lo infecte. Generalmente los VPH de bajo riesgo permanecen de forma episomal (DNA viral no integrado al DNA celular), la infección permanece latente sin manifestar cambios morfológicos o clínicos en el epitelio escamoso, la citología es interpretada como normal. En otras ocasiones se presenta una infección activa con una replicación vegetativa, esto induce la proliferación del epitelio escamoso formando lesiones verrucoides (verrugas y condilomas), estas lesiones suelen resolverse mediante el sistema inmune y desaparecen al cabo de unos meses.

En el caso de VPH de alto riesgo al inicio de la infección el genoma viral permanece en forma episomal, en determinadas condiciones de la célula huésped como inmunosupresión o cambios hormonales, se favorece la integración del genoma viral al genoma celular, esto promueve la expresión de oncogenes virales los cuales desregulan el control del ciclo de replicación celular (Jefrey et al, 1995). En estos casos los cambios morfológicos en las células epiteliales son perfectamente detectables (Ver figura 8).



**Fig. 8: Relación entre la integración del genoma viral y la citología vaginal.**

- A) Genoma viral episomal, no hay lesiones y se observa una citología normal.**
- B) Genoma viral episomal, presencia de lesiones verrucoides, citología poco diferenciada o normal.**
- C) Genoma integrado, existen lesiones de alto y bajo grado, se observa una citología anormal.**

Las lesiones causadas por VPH pueden ser displasias leves, moderadas o graves y carcinoma *in situ* según la nomenclatura empleada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Existen otras nomenclaturas como Richart y el sistema Bethesda (Ver figura 9).

OMS	Richart	Bethesda
Displasia Leve	NIC 1	LSIL
Displasia moderada	NIC 2	HSIL
Displasia Grave Carcinoma <i>in situ</i>	NIC 3	

Figura 9: Distintas nomenclaturas de lesiones de cuello uterino.

NIC: Neoplasia Intraepitelial cervical

LSIL: (Low intraepithelial Squamous lesion), Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado

HSIL: (High intraepithelial Squamous lesion), Lesión intraepitelial escamosa de alto grado

Se ha observado que no todas las lesiones precursoras necesariamente evolucionan a carcinoma invasor, numerosos autores han descrito la persistencia y regresión de las diversas lesiones intraepiteliales causadas por VPH. Se ha demostrado que en la mayor parte de los casos las lesiones intraepiteliales de bajo grado regresan a ASCUS (Atypical Cells of Undetermined Significance, células atípicas de significancia indeterminada) o a una citología normal y en su mayoría están asociadas a infecciones por VPH de bajo riesgo. En un estudio en 1993 se demostró lo siguiente:

Tabla 3: (Nassiel et al, 1992)

Lesión	Regresión	Persistencia	Progresión
LSIL	62%	22%	16%
HSIL	54%	16%	30%

Se ha demostrado que más del 80% de los casos con ASCUS y de los casos con LSIL regresan a la normalidad en aproximadamente 6 meses. El tiempo de regresión de las lesiones varía dependiendo del tipo viral, por ejemplo, la regresión de las LSIL con tipos de VPH oncogénicos es de aproximadamente 14 meses, mientras que el tiempo de regresión de las lesiones producidas por tipos de VPH no oncogénicos es de 8 meses, el tiempo de regresión de lesiones VPH negativo es de 7.4 meses.

La progresión de lesiones de ASCUS a LSIL o HSIL y de LSIL a HSIL, es más corto en mujeres infectadas con tipos de VPH de alto riesgo, que en mujeres infectadas por VPH de bajo riesgo y mujeres no infectadas por VPH. Por ello los tipos de VPH de alto riesgo están asociados a las lesiones de alto grado y al desarrollo de cáncer cervical, es importante señalar que el 80% de estas lesiones son pasajeras, asintomáticas y se resuelven sin algún tratamiento. Esto se debe a la respuesta inmune del huésped, a factores de riesgo de tipo ambiental propios de cada individuo y al tipo y variante de virus del papiloma humano (Ver figura 10).

## Prevalencia de progresión de lesiones en mujeres infectadas por VPH

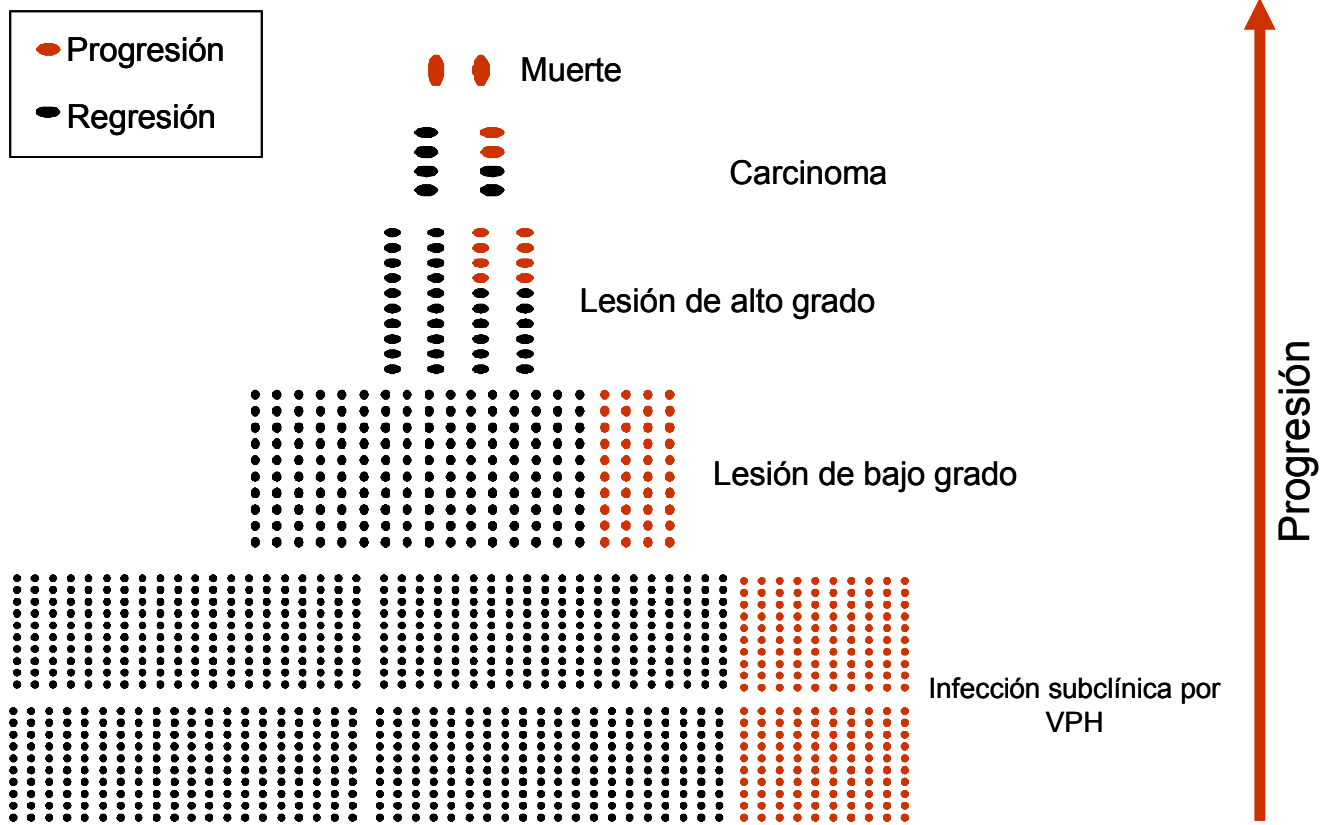


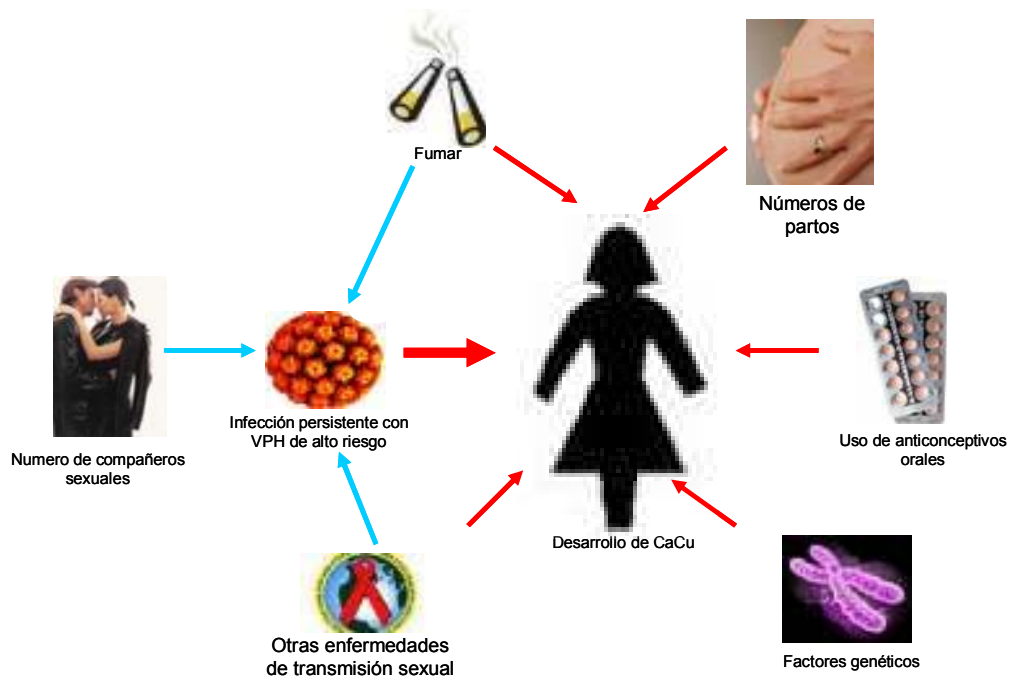
Fig. 10: Los puntos negros representan mujeres que presentan regresión en las lesiones y los puntos rojos representan mujeres que progresan a la siguiente lesión. De cada mil mujeres que cursan una infección subclínica por VPH, el 20% de ellas progresa a una lesión de bajo grado, de esas 200 mujeres el 20% progresa a una lesión de alto grado, de las 40 mujeres el 20% progresa a carcinoma, de las 8 mujeres con carcinoma, solo 1 o 2 mueren.



## Factores de riesgo asociados a la infección por VPH y al desarrollo de CaCu.

Las mujeres con infección persistente por tipos virales de alto riesgo pueden desarrollar cáncer cervical, sin embargo, de cada mil mujeres, sólo una o dos de ellas evolucionará hasta CaCu (Ver figura 10). Existen diferentes factores de riesgo para la infección por VPH, esta infección es transmitida sexualmente y representa la infección viral de transmisión sexual mas frecuente en el mundo (Woon-Won et al, 2004), uno de los factores de riesgo más importante para la adquisición del virus es el número de compañeros sexuales (Ishida et al, 2004), el tabaquismo ha sido positivamente asociado con la infección viral (Wang et al, 2003). Fumar diariamente durante más de 5 años incrementa la probabilidad de desarrollar cáncer cervical hasta 2.8 veces en mujeres VPH positivas (Shields et al, 2004).

Otros factores que parecen estar asociados son el número de partos, el uso de anticonceptivos orales y padecer otras enfermedades de transmisión sexual como clamidiasis y SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida) (Ver figura 11).



**Fig. 11: Factores de riesgo asociados a la infección por virus del papiloma humano (flechas azules) y factores de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical (flechas rojas).**

Existen también factores de riesgo de tipo genéticos, en el año 2002 se realizó un estudio cuyo objetivo era comprobar la tolerancia inmunológica de mujeres infectadas con VPH, los resultados de este estudio mostraron polimorfismos genéticos que no pudieron asociarse completamente al riesgo de desarrollar cáncer cervical. Sin embargo, los polimorfismos encontrados estuvieron ligados a la respuesta inmune y el procesamiento de antígenos, por lo que estos descubrimientos dieron un soporte para la hipótesis de que existen determinantes inmunogenéticas que pueden ser factores de riesgo para el desarrollo del cáncer (Calhoun et al, 2002).

La mayoría de los polimorfismos asociados al desarrollo de cáncer cervical se han descrito en genes del sistema inmune, por ejemplo se ha reportado que el polimorfismo en el promotor de la interleucina 6 (IL-6) puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer cervical (Nogueira et al, 2006). En estudios realizados en el sistema HLA clase II (human leukocyte antigen) para explicar porqué solo algunas mujeres infectadas con VPH progresan hasta cáncer cervical, interesantemente se descubrió que algunos haplotipos de los genes DRB1 y DQB1 ciertamente están asociados a una mayor susceptibilidad de desarrollar CaCu (Madelein et al, 2002). En otro estudio reciente se demostró que la variante -318 C/T del promotor del linfocito T-citotóxico del antígeno 4 (CTLA-4), está asociado a la infección por VPH 16 (Su et al, 2007). Diversos estudios epidemiológicos multidisciplinarios se han concentrado en el estudio de la carcinogénesis cervical, que además de ser inducida por la persistencia de la infección por VPH de alto riesgo, esta relacionada con factores genéticos adicionales. En un estudio empleando 387 microsatélites, los autores proponen un locus de susceptibilidad en la región 9q32 para el desarrollo de cáncer cervical y que el gen TSCOT es un candidato como gen de predisposición para este tipo de cáncer. (Engelmark et al, 2006).

Sin embargo todos estos estudios previos se han realizado básicamente en el ADN nuclear y sin tomar en cuenta los rasgos de población, por lo que , en este estudio surgió la inquietud por buscar una asociación entre factores de tipo genético y la infección por los tipos de virus del papiloma humano mas frecuentes en la población mexicana, para ello, decidimos analizar los polimorfismos en la región no codificable del ADN

mitocondrial, el cual es ampliamente usado en estudios poblacionales debido a las características a continuación descritas.

## **ADN MITOCONDRIAL HUMANO**

### **Descripción**

La mayor parte del ADN humano se encuentra en el núcleo celular; sin embargo, existe una pequeña porción en la mitocondria. El ADN mitocondrial (ADNm) es una molécula circular de doble cadena una ligera y otra cadena pesada de 16569 pares de bases, codifica para 37 genes entre los cuales se encuentran: 2 rRNAs, 22 tRNAs y 13 genes que codifican para proteínas que intervienen en la cadena de transporte de electrones.

El ADN mitocondrial contiene la región D-Loop (no codificable) que es de 1124 pares de bases, de la posición 16024 a 576, donde se encuentran promotores tanto en la cadena ligera como en la pesada, contiene también elementos de replicación y transcripcionales (Lewin 8th Ed pp. 75-78). La región D-Loop posee dos regiones hipervariables: HV1 (16024-16383) y HV2 (73-372). Estas regiones han sido empleadas en análisis forenses y en diagnósticos médicos. (Levin et al, 1999).

### **Características del ADNm:**

- Se encuentra en alto número de copias ( $10^3$ - $10^4$  copias por célula).
- La tasa de sustitución (mutaciones del cambio de un nucleótido por otro) es diez veces más alta que la tasa nuclear, lo que permite identificar individuos de parentesco cercano.
- Se hereda de la madre, lo que permite trazar líneas genéticas directas.
- No hay recombinación
- Es haploide (Ingman et al, 2000).

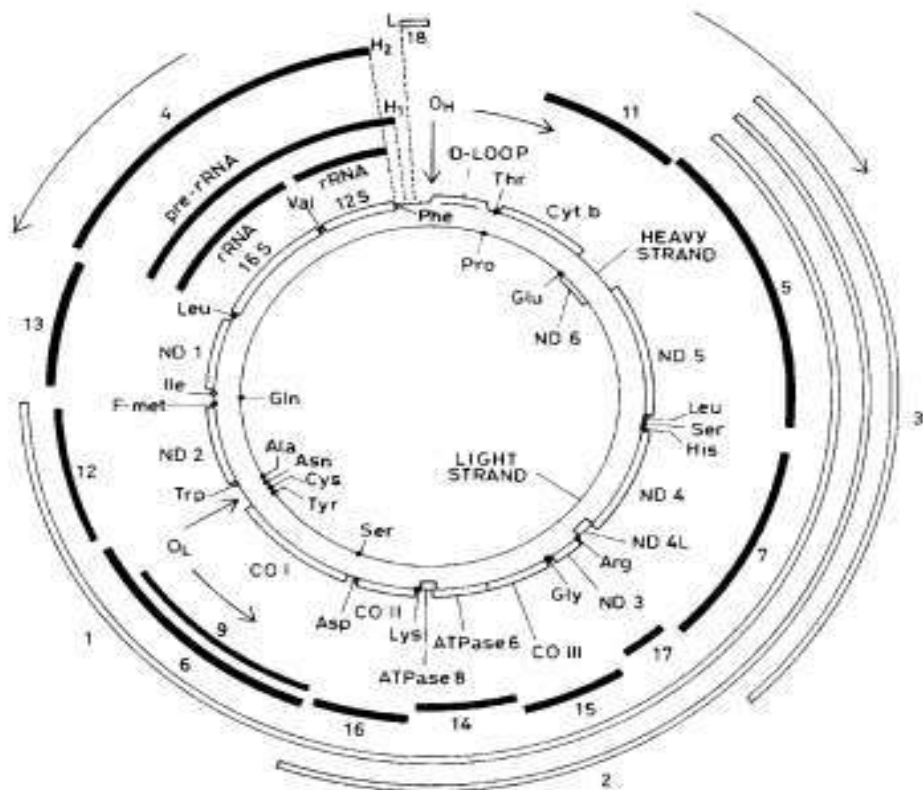


Fig. 12: Esquema del ADN mitocondrial

Por dichas características el ADNm es empleado en la identificación de individuos, en la creación de árboles filogenéticos y como marcador poblacional.

La mitocondria es el organelo encargado de producir energía para la célula mediante la fosforilación oxidativa, durante este proceso se generan moléculas de oxígeno reactivas (ROS). La alta tasa de mutación del ADNm es debido a la falta de reparación efectiva de histonas de protección, ineficiencias en los sistemas de reparación del ADN y la exposición continua a radicales libres, especies ROS (Miyasono et al, 1992).

Se han encontrado diversas asociaciones entre las mutaciones en el ADNm con desordenes metabólicos y en diversos tipos de cáncer, entre ellos, en cáncer colorectal y adenocarcinomas gástricos se han reportado transiciones en la región hipervariable I y transiciones, deleciones e inserciones en la región hipervariable II, por lo que se han

propuesto diversos mecanismos para explicar el incremento en la tasa de mutación del ADNm en estos padecimientos, como la expansión clonal y el aumento del daño por procesos de oxidación (Alonso et al, 1997). En estudios de tumores primarios de vejiga y cabeza y cuello se reporta una alta frecuencia de mutaciones en el ADNm, en cáncer de pulmón se han encontrado alteraciones frecuentes en la región D-Loop y se demostró una asociación con el estadio clínico (Suzuki et al, 2003). Se ha descrito frecuentemente una región altamente polimórfica en la región hipervariable II denominada D310 que es un tracto de policitocinas de la posición 303 a la 309, esta región ha sido asociada a diversos tipos de cáncer (Parella et al, 2003).

La mayoría de los polimorfismos descritos en estudios de asociación con el desarrollo de algún tipo de cáncer se encuentran principalmente en la región D-Loop y muy rara vez en la región codificable (Wang et al, 2006). De hecho, en cáncer cervical se han encontrado inserciones, deleciones y un tracto altamente polimórfico en el D-Loop, en la región hipervariable II, estas mutaciones se asociaron a la infección por VPH (Sharma et al, 2005), se propone que la mayoría de estas mutaciones son homoplasmicas convirtiéndose en mutaciones dominantes en las células tumorales, por lo que el hallazgo de las mismas podrían constituir un marcador molecular en la detección de algunos tipos de cáncer (Fliss et al, 2000).

## I. ANTECEDENTES

### VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO Y CÁNCER CERVICAL

El cáncer cervicouterino (CaCu) es la segunda neoplasia más común a nivel mundial, tiene una incidencia de medio millón de casos nuevos cada año. Este tipo de cáncer se presenta con mayor frecuencia en países en desarrollo (Ver figura 1) (Harro et al, 2001); y en México es la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres, presentando una incidencia de 44 casos por 100,000 mujeres (Lazcano-Ponce et al, 2001).

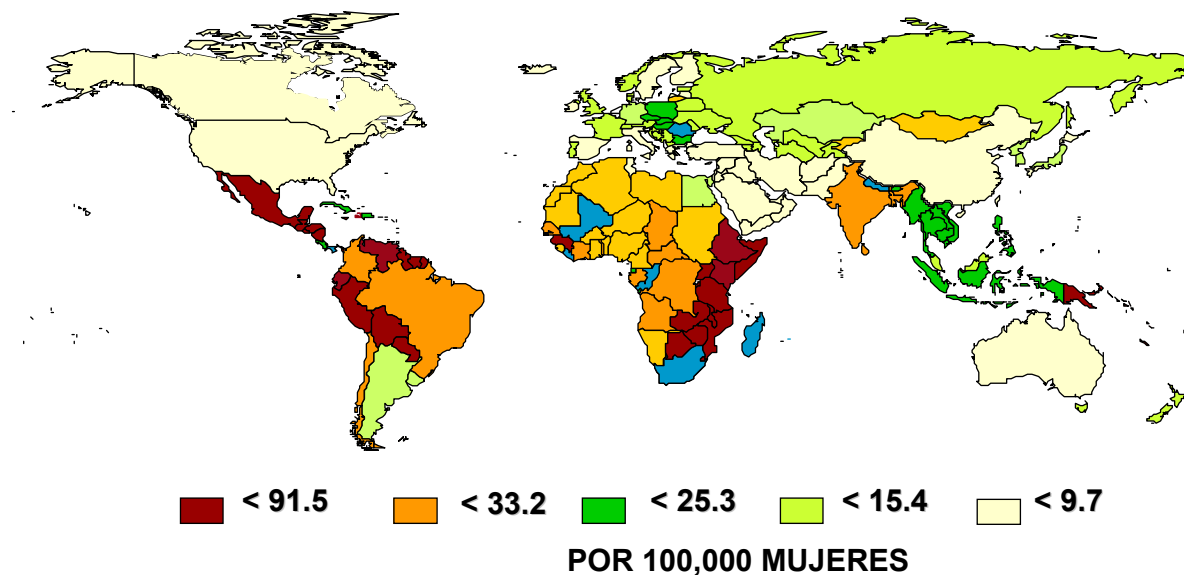


Fig. 1: Distribución de mujeres con cáncer cervical en el mundo. (Globocan 2002, IARC)

La correlación entre la infección genital del virus del papiloma humano (VPH) y el cáncer cervical fue documentada por primera vez a principios de los años 80 por Harold zur Hausen y se ha demostrado que existe un rol etiológico por la infección con algunos tipos del virus del papiloma humano (Franco et al, 2003). El VPH se ha encontrado como un factor fuertemente ligado al cáncer cervical invasivo, encontrándose hasta en un 99.7% de todos los casos de cáncer cervical escamoso (Walboomers et al, 1999).

La infección con VPH es una enfermedad de transmisión sexual muy común y se sugiere como la enfermedad viral de transmisión sexual más frecuente en el mundo. (Woon-Won et al, 2004). Por la asociación estricta entre el VPH y el cáncer cervical es necesario el estudio de este virus a fondo.

## VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO

### Taxonomía

Originalmente los virus del papiloma (VP) estaban agrupados dentro de la familia *Papovaviridae* basado en la cápside no envuelta y en que el material genético es DNA de doble cadena, posteriormente al analizar el tamaño y la organización de los genomas de los virus de esta familia, el Comité Internacional de Taxonomía viral (ICTV) reconoció a los VP como miembros de la familia *Papillomaviridae*.

Los virus del papiloma tienen un diámetro de aproximadamente 55 nm, con cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros, cada uno es un pentámero de la proteína mayor de la cápside L1 (Ver figura 2).



Fig. 2: Modelo de la estructura de la cápside del VPH 16 (Modis et al, 2002)

El genoma es una copia de DNA circular de doble cadena de aproximadamente 8000 pb y se organiza en 3 regiones: 1) La región reguladora de 400 a 1000 pb, contiene al promotor p97 el cual regula la replicación del DNA controlando la transcripción, ésta región tiene sitios de unión a E2 y el origen de replicación.

2) La región temprana donde se encuentran los genes que codifican para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 las cuales están involucradas en la replicación viral y los procesos de oncogénesis.

3) La región tardía donde se encuentran los genes que codifican para las proteínas estructurales de la cápside viral L1 y L2. La descripción de la organización del genoma viral se estudiará a detalle más adelante.

El gen LI es la secuencia más conservada del virus por lo que se emplea para la identificación de los tipos virales, para definir la existencia de nuevos tipos o variantes virales es necesario clonar el genoma viral completo y secuenciar el gen LI. Un nuevo tipo viral se reconoce cuando difiere en un 10% del genoma, una diferencia del 2-10% determina un subtipo y una diferencia menor al 2% determina una clase (De Villiers et al, 2004).



La clasificación actual de los PV consta de 17 géneros:

Tabla 1:

<b>Género</b>	<b>Especie</b>	<b>Propiedades biológicas</b>
Alpha-PV	15	Lesiones en mucosa y piel en primates y humanos.
Beta-PV	5	Lesiones cutáneas en humanos, infecciones latentes susceptibles a inmunosupresiones.
Gamma-PV	5	Lesiones cutáneas en humanos.
Delta-PV	4	Inducen fibropapilomas en caballos.
Epsilon-PV	1	Lesiones cutáneas bovinas.
Zeta-PV	1	Lesiones cutáneas en caballos.
Eta-PV	1	Lesiones cutáneas en aves.
Theta-PV	1	Lesiones cutáneas en aves.
Iota-PV	1	Lesiones cutáneas en roedores.
Kappa-PV	2	Lesiones en mucosa y piel en conejos.
Lamda-PV	2	Lesiones benignas en mamíferos.
Mu-VP	2	Lesiones cutáneas en humanos.
Nu-PV	1	Lesiones cutáneas benignas y malignas en humanos.
Xi-PV	1	Lesiones cutáneas y en mucosa en bovinos.
Omikron-PV	1	Verruugas genitales en cetáceos.
Pi-PV	1	Lesiones en mucosa aislada de hamsters.

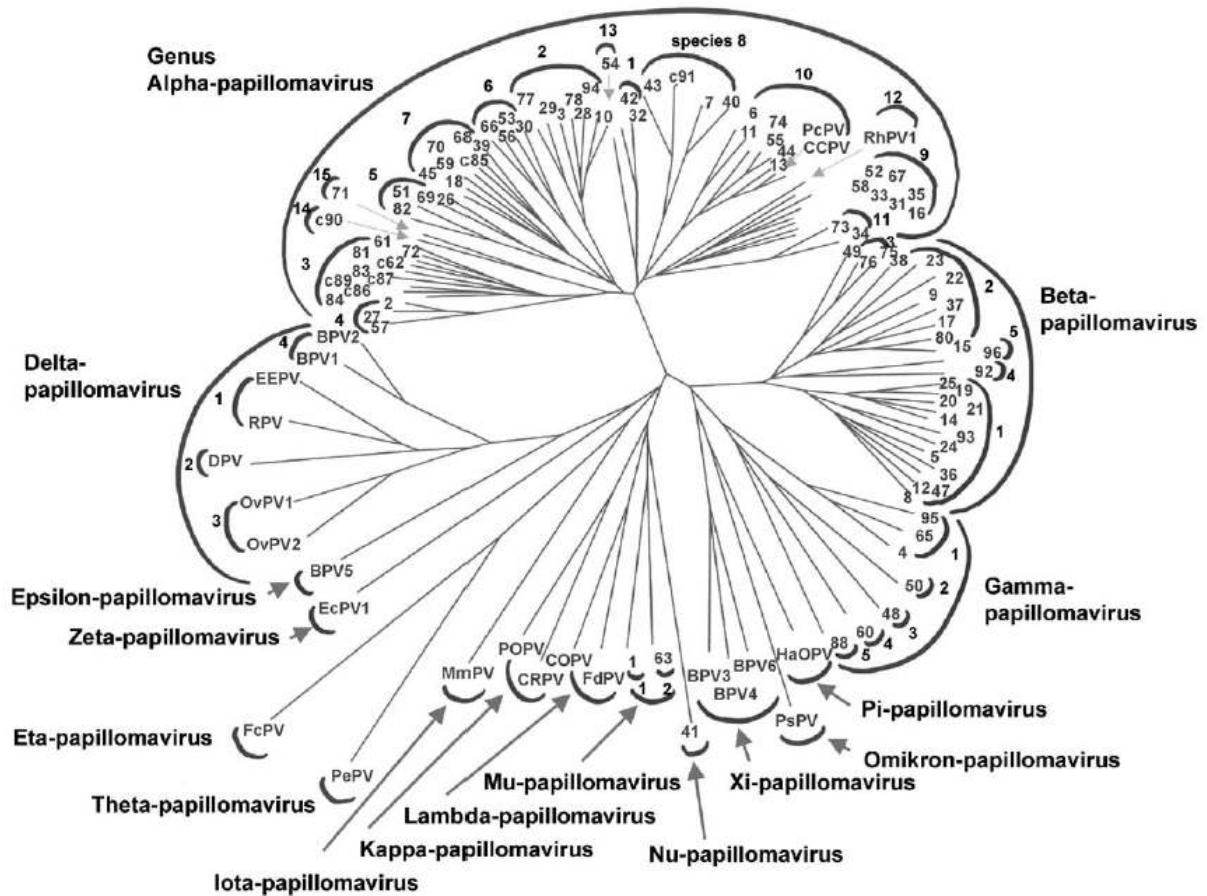


Fig. 3: Árbol filogenético de los Papillomavirus (De Villiers et al, 2004).

Debido a la similitud en la secuencia los VP del género alfa se agrupan en 15 familias, los tipos 18, 39, 45, 59, 68, 70 y c85 pertenecen a la especie 7; los tipos 16, 31, 33, 35, 52, 58 y 67 pertenecen a la especie 9, los tipos virales de bajo riesgo más frecuentes son el 6 y el 11, los cuales se agrupan en la especie 10.

## Clasificación

Los alfa-papillomavirus se han clasificado en virus de alto riesgo, que corresponden a los tipos virales asociados a procesos malignos, y de bajo riesgo, que son los tipos virales asociados a lesiones benignas.

Tabla 2: (Muñoz et al, 2003)

Virus de alto riesgo	Virus de bajo riesgo
16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81

Los tipos virales 68, 73 y 82 se consideran de probable alto riesgo.

El VPH18 es el segundo tipo más frecuente en el mundo, encontrándose en un 20% de las infecciones por VPH, se ha demostrado que este tipo viral tiene una alta actividad transcripcional, lo que sugiere que es más agresivo que el VPH16 (Scheurer et al, 2005).

El VPH16 se encuentra en un 55% de las mujeres infectadas con algún tipo de papiloma (Muñoz et al, 2003), está altamente asociado a cáncer cervical invasivo, por ello la mayoría de los estudios para elucidar los mecanismos carcinogénicos se realizan enfocados en este tipo viral.

Los tipos virales son un conjunto de virus o variantes genéticas que difieren entre sí hasta en un 2% de su genoma, algunos de ellos se han asociado a lesiones más avanzadas o tipos histológicos más agresivos (Zehbel et al, 1998).

Las variantes virales del VPH16 se distribuyen de manera distinta en el mundo, las variantes Asiático-Americanas (AA) se encuentran principalmente en México, Centro y Sudamérica y España, las variantes africanas (Af) en África, las variantes asiáticas (As) en el sudeste de Asia y las variantes Europeas en todas las regiones excepto África (Yamada et al, 1997). Recientemente en México se descubrió la variedad Asiático-Americana compuesta por las subclases AA-a y AA-c del VPH16 (Casas et al, 1999). La variante AA se detecta en aproximadamente un 25% de las mujeres con CaCu de nuestro país, se ha demostrado que las mujeres que están infectadas con el VPH16 AA

tienen 27 veces más probabilidades de desarrollar cáncer cervical comparado con las mujeres negativas para este virus (Berumen et al, 2001).

Debido a su potencial oncogénico y a su alta frecuencia en nuestro país el estudio de estas variantes es sumamente importante.

Para la comprensión de los mecanismos oncogénicos virales es necesario el estudio del genoma viral, a continuación se hará una descripción de cada gen (Ver figura 4).

## Organización genómica

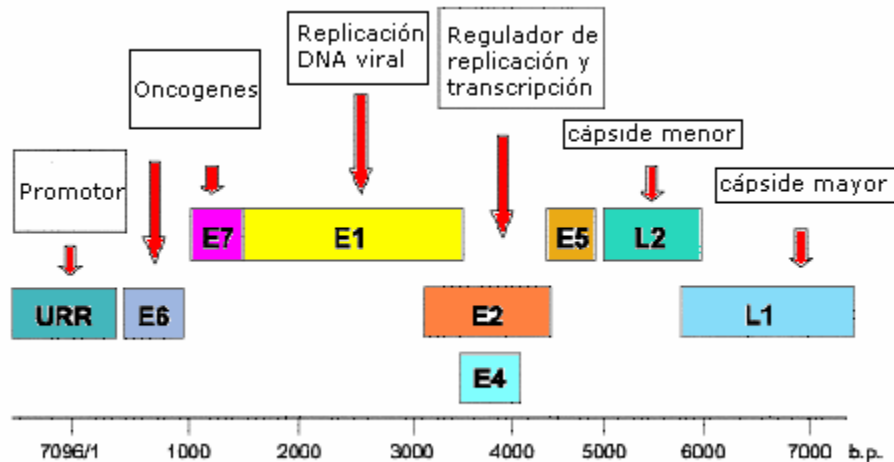


Fig. 4: Organización genómica del VPH

El gen E6 codifica para una oncoproteína de aproximadamente 16-19 KDa, de 151 aminoácidos. Se han descrito diversas funciones de la proteína E6 como su participación en la inmortalización celular, en efectos antiapoptóticos, en la desestabilización cromosomal y la activación de la telomerasa (Haussen, 2000). La proteína E6 de los tipos virales de alto riesgo se une a p53 para degradarla, este mecanismo es mediante la unión de la proteína E6 a una proteína celular de 100 kDa denominada proteína de asociación a E6 (E6-AP). El complejo E6-E6-AP interactúa con p53 y la degrada empleando la vía proteolítica dependiente de ubiquitina (Werness et al, 1990). La ubiquitinación de este supresor tumoral requiere las enzimas E1 (enzima activadora de la

ubiquitina) y E2 (enzima de conjugación de la ubiquitina) (Scheffner et al, 1993). En condiciones normales p53 induce la apoptosis y frena el ciclo celular en respuesta al estrés genotóxico y daño al DNA (Ver figura 5), por lo que si E6 degrada a p53, el ciclo celular se desregula y la célula se immortaliza (Ver figura 6).

La proteína E6 también se une a las siguientes proteínas:

- ERC55: Proteína con dominio de unión a calcio (Chen et al, 1995).
- hDlg: Proteína supresora de tumores de *D. melanogaster*. Homóloga humana (Kiyono et al, 1997).
- Paxilina: Proteína de adhesión focal involucrada en la traducción de señales de la membrana plasmática al citoesqueleto de actina (Tong y Hawley, 1997).
- Factor 3 regulador de interferón: Componente del complejo del factor de activación transcripcional viral (Ronco et al, 1998).
- Bak: Antagonista homólogo de bcl-2 y promotor de la apoptosis (Thomas y Banks, 1999).
- E6TPI: Proteína blanco de E6 (Gao et al, 1999).

El gen E7 codifica para la oncoproteína E7 de 10-14 kD, la cuál se une e inactiva a la forma hipofosforilada de la proteína de retinoblastoma (pRb) para degradarla por ubiquitinación (Dyson et al, 1989). La pRb es una proteína inhibidora que mantiene atrapado al factor de transcripción E2F, éste factor en conjunción con Hct1 y p27 impiden la progresión del ciclo celular al final de G1 (Ver figura 5). La unión entre E7 y pRb provoca la liberación de E2F estimulándose la expresión de genes involucrados en la síntesis del DNA y en la progresión de la fase G1 a la fase S (Foster et al, 1996), por lo que la proteína E7 está asociada a procesos de immortalización celular (Bandara et al, 1991) (Ver figura 6).

La proteína E7 de papilomavirus de alto riesgo forma complejos con las ciclinas A y E (Arroyo et al, 1993), estos complejos tienen una actividad cinasa que se asocia con procesos de transformación (Zerfass et al, 1995). E7 participa en la inducción de apoptosis dependiente de p53 (Puthenveetil et al, 1996); se ha observado que cuando

existen mutaciones en p53 la proteína E7 ejerce un efecto antiapoptótico (Magal et al, 1998). La proteína E7 promueve la integración del DNA viral al genoma celular, como resultado hay un incremento en los procesos de mutagénesis (Resnikoff et al, 1996). Otra función relevante de la proteína E7 es la inhibición de cinasas dependientes de ciclinas como p21<sup>CIP-1</sup> y p27<sup>KIP-1</sup>, lo cual estimula la proliferación de células infectadas (Zerfass-Thoma, 1996).

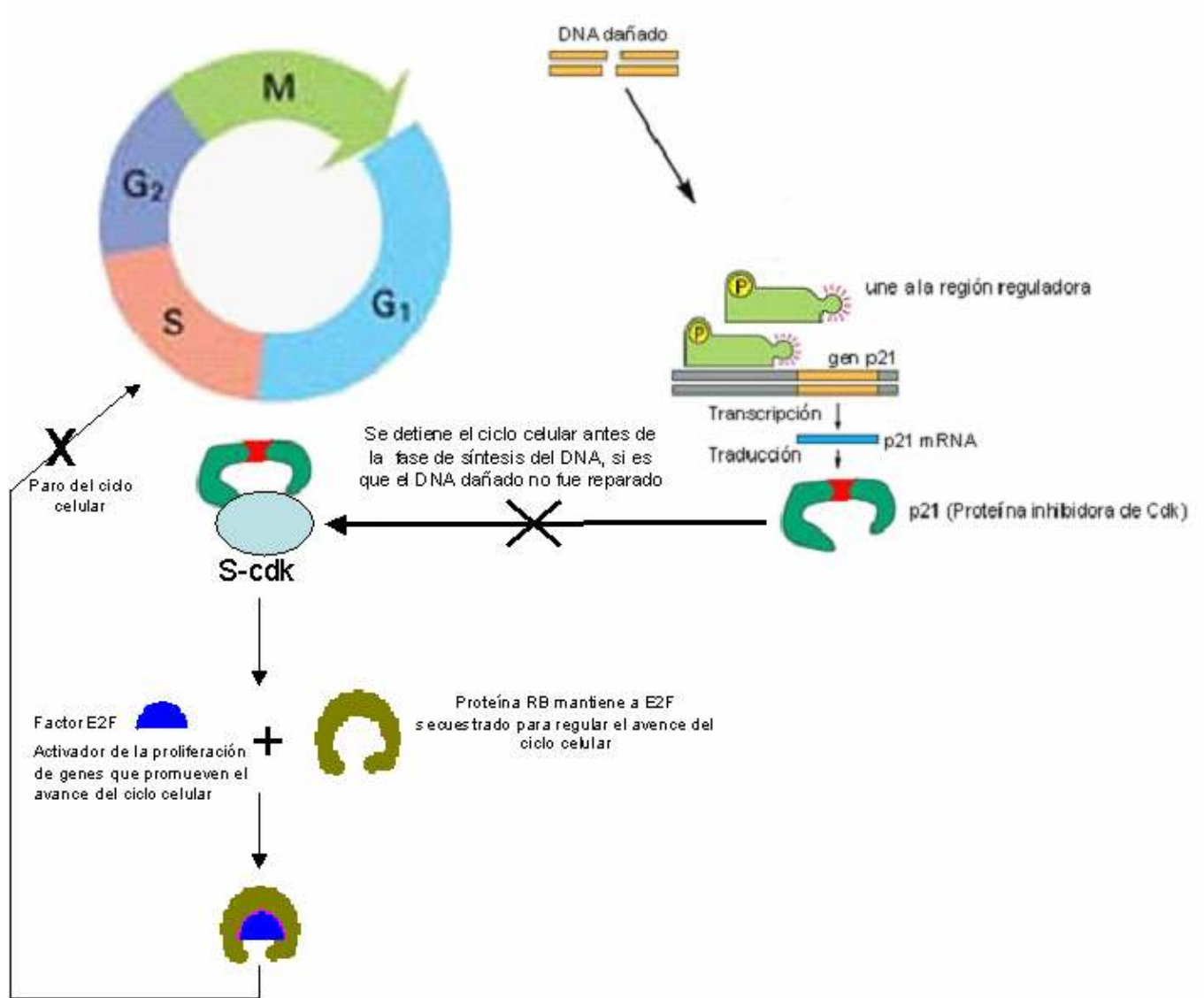


Fig 5: Funciones de p53 y pRB en una célula normal. En presencia de DNA dañado p53 actúa por medio de la proteína p21, para detener el ciclo celular antes de la síntesis de nuevo DNA, como el daño es irreparable la célula entra en apoptosis mediada por p53. En el caso de la proteína de retinoblastoma, la regulación en la progresión del ciclo celular es manteniendo atrapado a E2F, el cual es un activador de genes que participan en la progresión del ciclo. Tanto p53 como pRB regulan la progresión del ciclo celular.

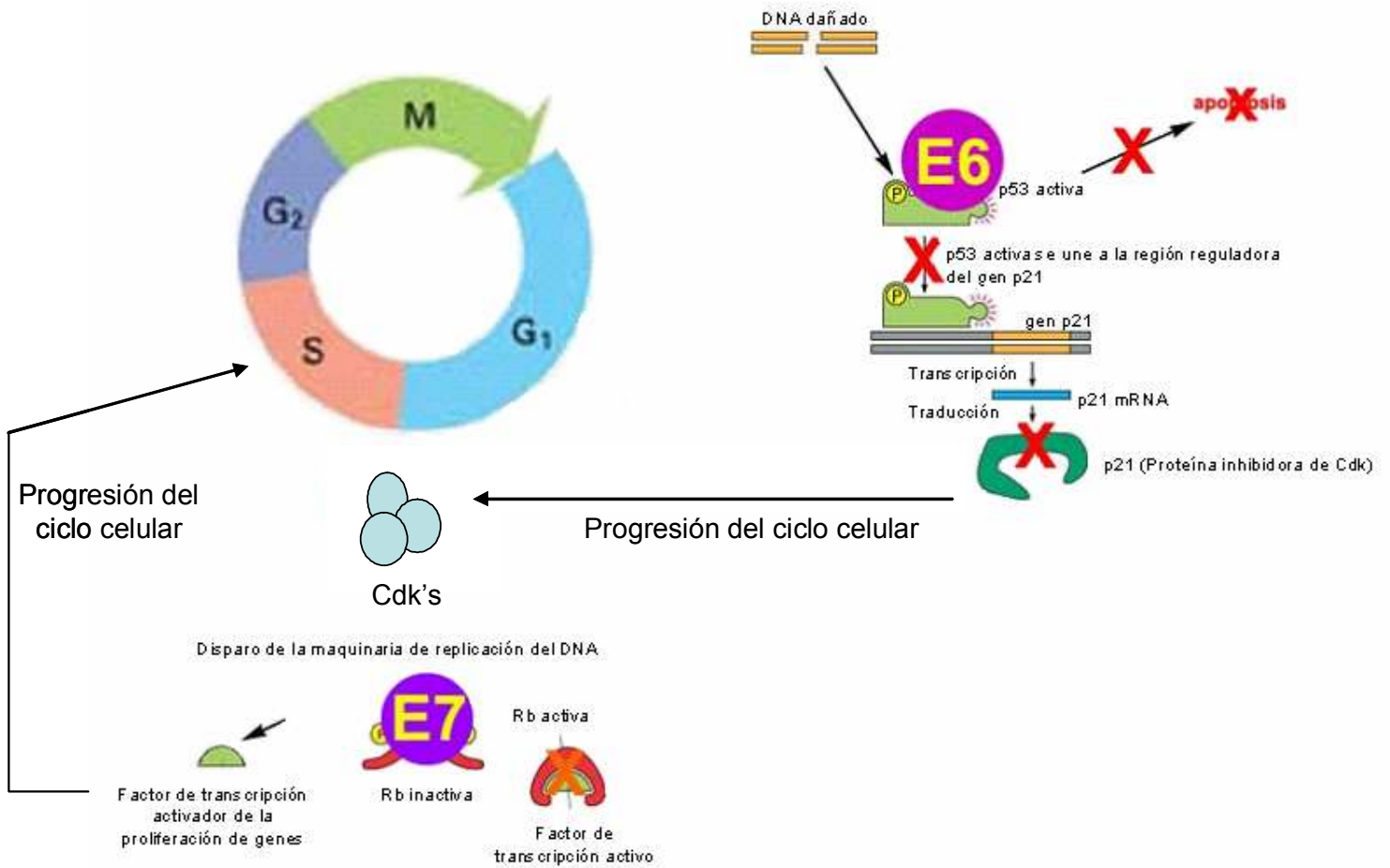


Fig 6. La oncoproteína E6 se une a p53 marcándola para degradarla empleando la vía proteolítica dependiente de ubiquitina, evitando que la célula se vaya a apoptosis, por otro lado la oncoproteína E7 se une a pRB, lo que resulta en la liberación del E2F y como consecuencia la progresión del ciclo celular.



El gen E1 codifica para la proteína más larga del virus (68-76 kD), la proteína E1 es una fosfoproteína nuclear esencial para la replicación del virus, E1 se une con baja afinidad al origen de replicación que se localiza dentro de LCR (Long Control Region). La función de la proteína E1 es la actividad de helicasa durante la replicación del DNA viral, y la interacción con la DNA polimerasa  $\alpha$  / primasa (Conger et al, 1999).

El gen E2 codifica para una proteína de unión de alta afinidad al DNA que reconoce la secuencia 5'AACCGN(4)CGGTT3' localizada en la LCR ( Dell et al, 2003), la proteína E2 de 45KDa se encarga de modular la transcripción y la replicación viral, esta proteína es un represor de la transcripción de genes tempranos. En la estructura cuaternaria de E2 existen tres dominios funcionales, el dominio de transactivación transcripcional N-terminal, la region de bisagra que es rica en prolinas y el dominio de unión a DNA C-terminal. (Graham et al, 2000) (Giri et al, 1988). Estudios *in vitro* han demostrado que el promotor de los oncogenes E6 y E7 es regulado por la proteína E2 (Sanders et al, 1994 ), cuando la proteína E2 se une a dicho promotor la transcripción de E6 y E7 se ve impedida por un efecto estérico. Durante la integración del genoma viral al genoma celular hay una ruptura de la región E1-E2, cuando esto sucede resulta en la perdida de la función de la proteína E2, ocasionando un descontrol en la expresión de los oncogenes E6 y E7 (Kalantari et al, 1998).

El gen E4 codifica para una proteína que se expresa durante los procesos de desensamblaje de las partículas virales, también se ha involucrado en los procesos de transformación del genoma del huésped mediante desregulación de la vía de señalización mitogénica.

El gen E5 codifica para una proteína hidrofóbica que se encuentra normalmente en la membrana citoplasmática y en el aparato de Golgi. La proteína E5 forma complejos con otras proteínas transmembranales como el receptor del factor de crecimiento epidermal, el receptor del factor  $\beta$  de crecimiento derivado de plaquetas y el receptor del factor de estimulación de colonias.

Se ha descrito que el marco abierto de lectura para E5 se modifica en células malignas, esto provoca la pérdida de la proteína E5 o una disminución en su expresión, estos eventos sugieren un rol importante de E5 durante la carcinogénesis cervical, pero no es indispensable durante la persistencia y la progresión del proceso maligno (Kim et al, 2006). Actualmente la contribución de E5 no está completamente entendida.

## Patogenia

El VPH puede inducir infecciones líticas, crónicas, latentes y de transformación dependiendo de la célula hospedera. Los VPH cutáneos infectan y se replican en el epitelio escamoso produciendo lesiones verrucoides. Los VPH de mucosa infectan y se replican en membranas de las mucosas genital, oral y conjuntiva induciendo proliferación epitelial (Faire et al, 1985).

La infección por VPH ocurre por transmisión sexual cuando el virus penetra a través de microlesiones o laceraciones en las células del epitelio basal. Las lesiones causadas por VPH epiteliotrópicos aparecen después de 4 a 6 semanas. Los tres tipos de epitelio escamoso (queratinizado, no queratinizado y metaplásico) son susceptibles a la infección viral.

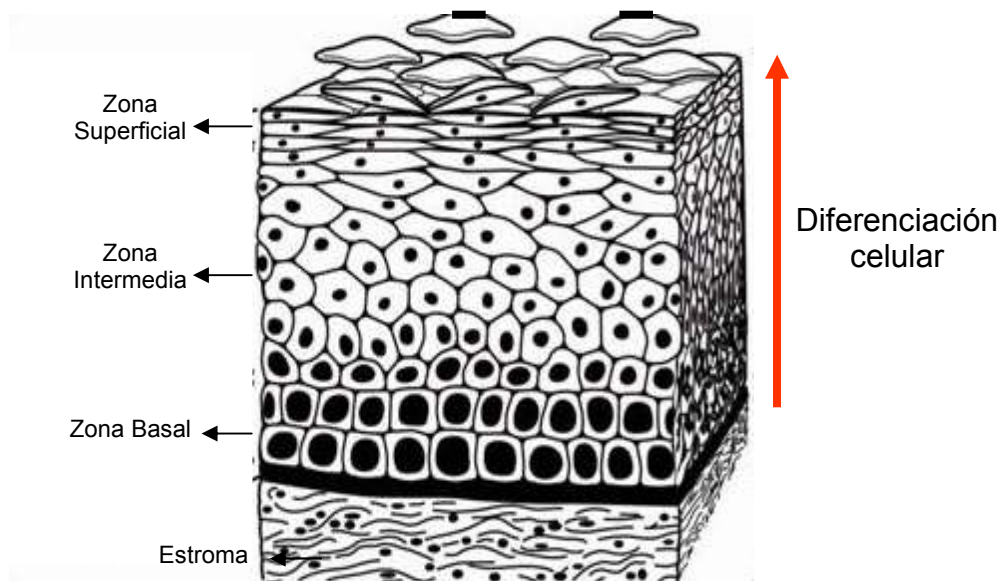
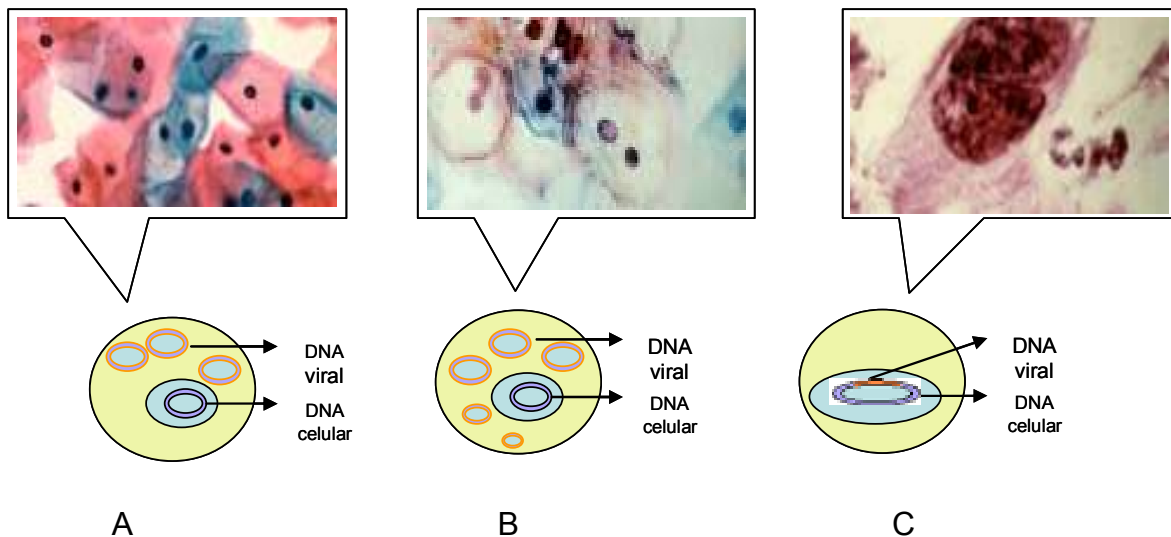


Figura 7: Estratos del epitelio escamoso

Las manifestaciones clínicas y morfológicas en el epitelio dependen del tipo viral que lo infecte. Generalmente los VPH de bajo riesgo permanecen de forma episomal (DNA viral no integrado al DNA celular), la infección permanece latente sin manifestar cambios morfológicos o clínicos en el epitelio escamoso, la citología es interpretada como normal. En otras ocasiones se presenta una infección activa con una replicación vegetativa, esto induce la proliferación del epitelio escamoso formando lesiones verrucoides (verrugas y condilomas), estas lesiones suelen resolverse mediante el sistema inmune y desaparecen al cabo de unos meses.

En el caso de VPH de alto riesgo al inicio de la infección el genoma viral permanece en forma episomal, en determinadas condiciones de la célula huésped como inmunosupresión o cambios hormonales, se favorece la integración del genoma viral al genoma celular, esto promueve la expresión de oncogenes virales los cuales desregulan el control del ciclo de replicación celular (Jefrey et al, 1995). En estos casos los cambios morfológicos en las células epiteliales son perfectamente detectables (Ver figura 8).



**Fig. 8: Relación entre la integración del genoma viral y la citología vaginal.**

- A) Genoma viral episomal, no hay lesiones y se observa una citología normal.**
- B) Genoma viral episomal, presencia de lesiones verrucoides, citología poco diferenciada o normal.**
- C) Genoma integrado, existen lesiones de alto y bajo grado, se observa una citología anormal.**

Las lesiones causadas por VPH pueden ser displasias leves, moderadas o graves y carcinoma *in situ* según la nomenclatura empleada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Existen otras nomenclaturas como Richart y el sistema Bethesda (Ver figura 9).

OMS	Richart	Bethesda
Displasia Leve	NIC 1	LSIL
Displasia moderada	NIC 2	HSIL
Displasia Grave Carcinoma <i>in situ</i>	NIC 3	

Figura 9: Distintas nomenclaturas de lesiones de cuello uterino.

NIC: Neoplasia Intraepitelial cervical

LSIL: (Low intraepithelial Squamous lesion), Lesión intraepitelial escamosa de bajo grado

HSIL: (High intraepithelial Squamous lesion), Lesión intraepitelial escamosa de alto grado

Se ha observado que no todas las lesiones precursoras necesariamente evolucionan a carcinoma invasor, numerosos autores han descrito la persistencia y regresión de las diversas lesiones intraepiteliales causadas por VPH. Se ha demostrado que en la mayor parte de los casos las lesiones intraepiteliales de bajo grado regresan a ASCUS (Atypical Cells of Undetermined Significance, células atípicas de significancia indeterminada) o a una citología normal y en su mayoría están asociadas a infecciones por VPH de bajo riesgo. En un estudio en 1993 se demostró lo siguiente:

Tabla 3: (Nassiel et al, 1992)

Lesión	Regresión	Persistencia	Progresión
LSIL	62%	22%	16%
HSIL	54%	16%	30%

Se ha demostrado que más del 80% de los casos con ASCUS y de los casos con LSIL regresan a la normalidad en aproximadamente 6 meses. El tiempo de regresión de las lesiones varía dependiendo del tipo viral, por ejemplo, la regresión de las LSIL con tipos de VPH oncogénicos es de aproximadamente 14 meses, mientras que el tiempo de regresión de las lesiones producidas por tipos de VPH no oncogénicos es de 8 meses, el tiempo de regresión de lesiones VPH negativo es de 7.4 meses.

La progresión de lesiones de ASCUS a LSIL o HSIL y de LSIL a HSIL, es más corto en mujeres infectadas con tipos de VPH de alto riesgo, que en mujeres infectadas por VPH de bajo riesgo y mujeres no infectadas por VPH. Por ello los tipos de VPH de alto riesgo están asociados a las lesiones de alto grado y al desarrollo de cáncer cervical, es importante señalar que el 80% de estas lesiones son pasajeras, asintomáticas y se resuelven sin algún tratamiento. Esto se debe a la respuesta inmune del huésped, a factores de riesgo de tipo ambiental propios de cada individuo y al tipo y variante de virus del papiloma humano (Ver figura 10).

## Prevalencia de progresión de lesiones en mujeres infectadas por VPH

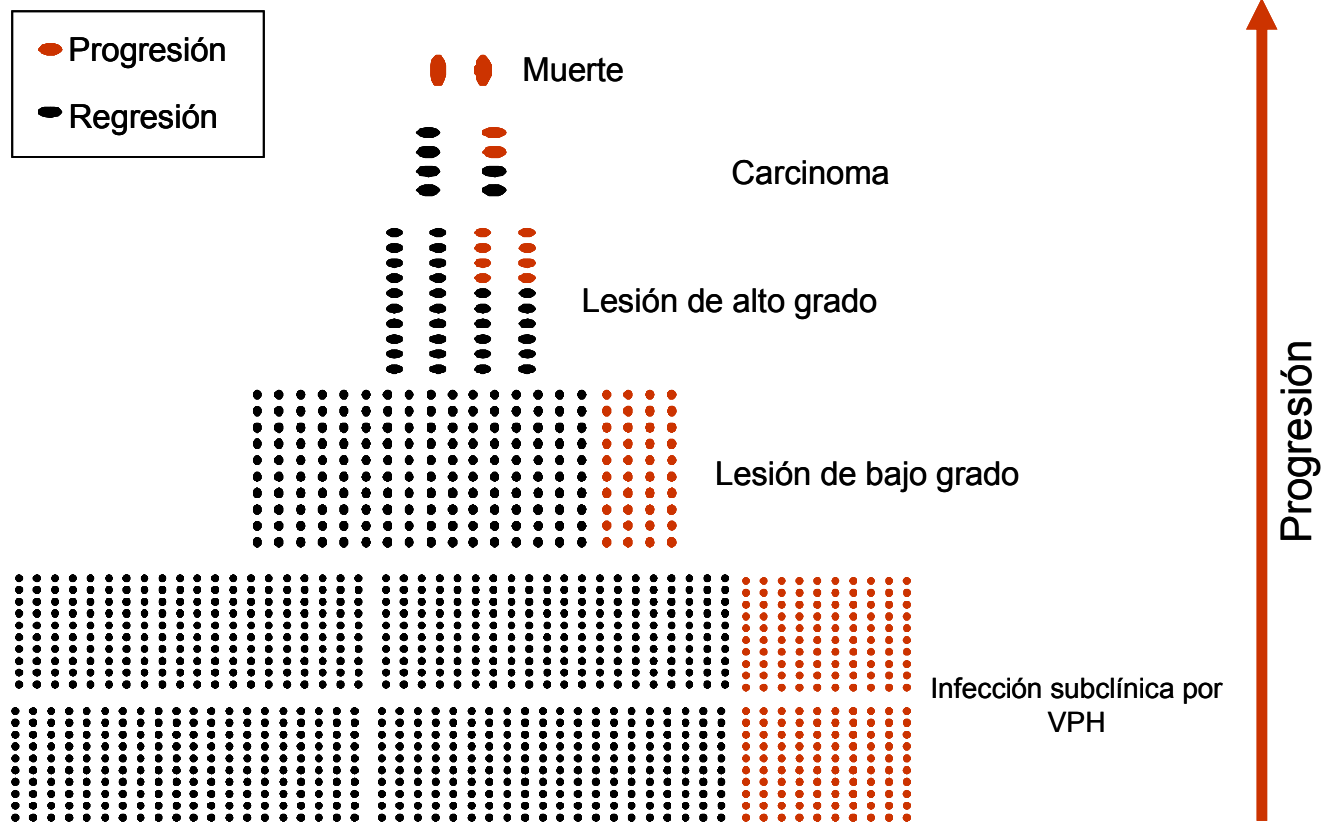


Fig. 10: Los puntos negros representan mujeres que presentan regresión en las lesiones y los puntos rojos representan mujeres que progresan a la siguiente lesión. De cada mil mujeres que cursan una infección subclínica por VPH, el 20% de ellas progresa a una lesión de bajo grado, de esas 200 mujeres el 20% progresa a una lesión de alto grado, de las 40 mujeres el 20% progresa a carcinoma, de las 8 mujeres con carcinoma, solo 1 o 2 mueren.

## Factores de riesgo asociados a la infección por VPH y al desarrollo de CaCu.

Las mujeres con infección persistente por tipos virales de alto riesgo pueden desarrollar cáncer cervical, sin embargo, de cada mil mujeres, sólo una o dos de ellas evolucionará hasta CaCu (Ver figura 10). Existen diferentes factores de riesgo para la infección por VPH, esta infección es transmitida sexualmente y representa la infección viral de transmisión sexual mas frecuente en el mundo (Woon-Won et al, 2004), uno de los factores de riesgo más importante para la adquisición del virus es el número de compañeros sexuales (Ishida et al, 2004), el tabaquismo ha sido positivamente asociado con la infección viral (Wang et al, 2003). Fumar diariamente durante más de 5 años incrementa la probabilidad de desarrollar cáncer cervical hasta 2.8 veces en mujeres VPH positivas (Shields et al, 2004).

Otros factores que parecen estar asociados son el número de partos, el uso de anticonceptivos orales y padecer otras enfermedades de transmisión sexual como clamidiasis y SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida) (Ver figura 11).

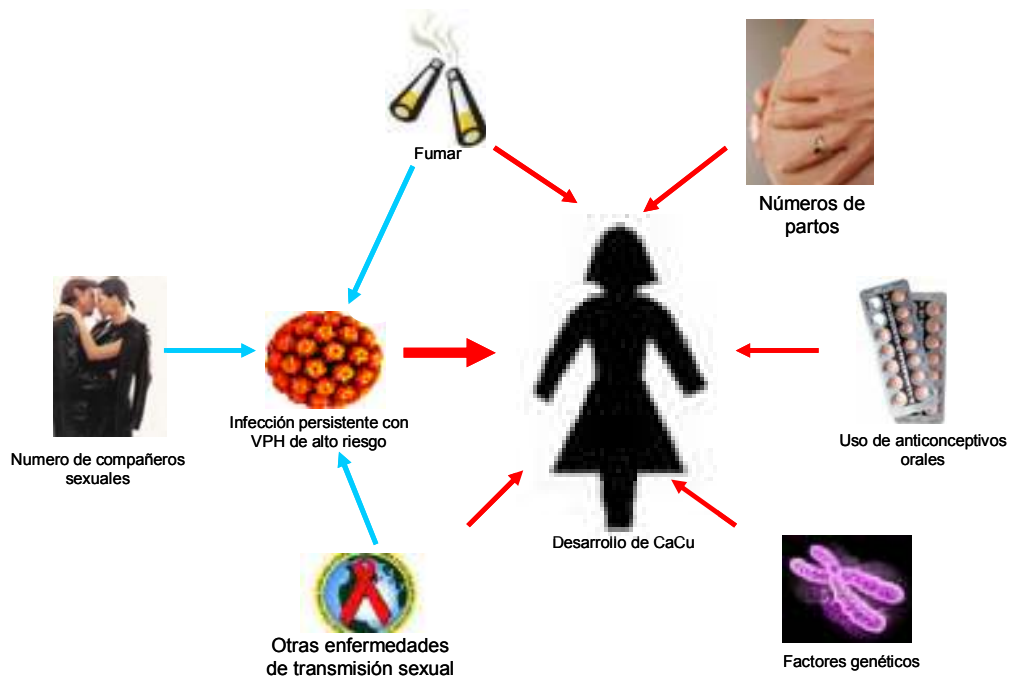


Fig. 11: Factores de riesgo asociados a la infección por virus del papiloma humano (flechas azules) y factores de riesgo para el desarrollo de cáncer cervical (flechas rojas).

Existen también factores de riesgo de tipo genéticos, en el año 2002 se realizó un estudio cuyo objetivo era comprobar la tolerancia inmunológica de mujeres infectadas con VPH, los resultados de este estudio mostraron polimorfismos genéticos que no pudieron asociarse completamente al riesgo de desarrollar cáncer cervical. Sin embargo, los polimorfismos encontrados estuvieron ligados a la respuesta inmune y el procesamiento de antígenos, por lo que estos descubrimientos dieron un soporte para la hipótesis de que existen determinantes inmunogenéticas que pueden ser factores de riesgo para el desarrollo del cáncer (Calhoun et al, 2002).

La mayoría de los polimorfismos asociados al desarrollo de cáncer cervical se han descrito en genes del sistema inmune, por ejemplo se ha reportado que el polimorfismo en el promotor de la interleucina 6 (IL-6) puede aumentar el riesgo de desarrollar cáncer cervical (Nogueira et al, 2006). En estudios realizados en el sistema HLA clase II (human leukocyte antigen) para explicar porqué solo algunas mujeres infectadas con VPH progresan hasta cáncer cervical, interesantemente se descubrió que algunos haplotipos de los genes DRB1 y DQB1 ciertamente están asociados a una mayor susceptibilidad de desarrollar CaCu (Madelein et al, 2002). En otro estudio reciente se demostró que la variante -318 C/T del promotor del linfocito T-citotóxico del antígeno 4 (CTLA-4), está asociado a la infección por VPH 16 (Su et al, 2007). Diversos estudios epidemiológicos multidisciplinarios se han concentrado en el estudio de la carcinogénesis cervical, que además de ser inducida por la persistencia de la infección por VPH de alto riesgo, esta relacionada con factores genéticos adicionales. En un estudio empleando 387 microsatélites, los autores proponen un locus de susceptibilidad en la región 9q32 para el desarrollo de cáncer cervical y que el gen TSCOT es un candidato como gen de predisposición para este tipo de cáncer. (Engelmark et al, 2006).

Sin embargo todos estos estudios previos se han realizado básicamente en el ADN nuclear y sin tomar en cuenta los rasgos de población, por lo que , en este estudio surgió la inquietud por buscar una asociación entre factores de tipo genético y la infección por los tipos de virus del papiloma humano mas frecuentes en la población mexicana, para ello, decidimos analizar los polimorfismos en la región no codificable del ADN



mitocondrial, el cual es ampliamente usado en estudios poblacionales debido a las características a continuación descritas.

## **ADN MITOCONDRIAL HUMANO**

### **Descripción**

La mayor parte del ADN humano se encuentra en el núcleo celular; sin embargo, existe una pequeña porción en la mitocondria. El ADN mitocondrial (ADNm) es una molécula circular de doble cadena una ligera y otra cadena pesada de 16569 pares de bases, codifica para 37 genes entre los cuales se encuentran: 2 rRNAs, 22 tRNAs y 13 genes que codifican para proteínas que intervienen en la cadena de transporte de electrones.

El ADN mitocondrial contiene la región D-Loop (no codificable) que es de 1124 pares de bases, de la posición 16024 a 576, donde se encuentran promotores tanto en la cadena ligera como en la pesada, contiene también elementos de replicación y transcripcionales (Lewin 8th Ed pp. 75-78). La región D-Loop posee dos regiones hipervariables: HV1 (16024-16383) y HV2 (73-372). Estas regiones han sido empleadas en análisis forenses y en diagnósticos médicos. (Levin et al, 1999).

### **Características del ADNm:**

- Se encuentra en alto número de copias ( $10^3$ - $10^4$  copias por célula).
- La tasa de sustitución (mutaciones del cambio de un nucleótido por otro) es diez veces más alta que la tasa nuclear, lo que permite identificar individuos de parentesco cercano.
- Se hereda de la madre, lo que permite trazar líneas genéticas directas.
- No hay recombinación
- Es haploide (Ingman et al, 2000).

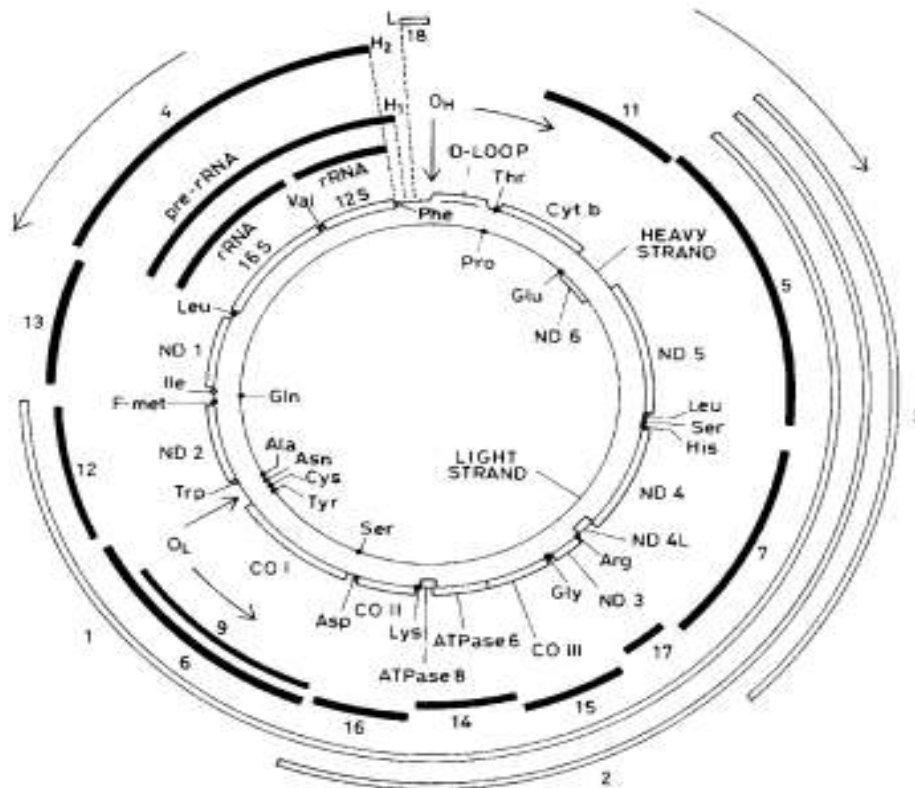


Fig. 12: Esquema del ADN mitocondrial

Por dichas características el ADNm es empleado en la identificación de individuos, en la creación de árboles filogenéticos y como marcador poblacional.

La mitocondria es el organelo encargado de producir energía para la célula mediante la fosforilación oxidativa, durante este proceso se generan moléculas de oxígeno reactivas (ROS). La alta tasa de mutación del ADNm es debido a la falta de reparación efectiva de histonas de protección, ineficiencias en los sistemas de reparación del ADN y la exposición continua a radicales libres, especies ROS (Miyasono et al, 1992).

Se han encontrado diversas asociaciones entre las mutaciones en el ADNm con desordenes metabólicos y en diversos tipos de cáncer, entre ellos, en cáncer colorectal y adenocarcinomas gástricos se han reportado transiciones en la región hipervariable I y transiciones, deleciones e inserciones en la región hipervariable II, por lo que se han

propuesto diversos mecanismos para explicar el incremento en la tasa de mutación del ADNm en estos padecimientos, como la expansión clonal y el aumento del daño por procesos de oxidación (Alonso et al, 1997). En estudios de tumores primarios de vejiga y cabeza y cuello se reporta una alta frecuencia de mutaciones en el ADNm, en cáncer de pulmón se han encontrado alteraciones frecuentes en la región D-Loop y se demostró una asociación con el estadio clínico (Suzuki et al, 2003). Se ha descrito frecuentemente una región altamente polimórfica en la región hipervariable II denominada D310 que es un tracto de policitocinas de la posición 303 a la 309, esta región ha sido asociada a diversos tipos de cáncer (Parella et al, 2003).

La mayoría de los polimorfismos descritos en estudios de asociación con el desarrollo de algún tipo de cáncer se encuentran principalmente en la región D-Loop y muy rara vez en la región codificable (Wang et al, 2006). De hecho, en cáncer cervical se han encontrado inserciones, deleciones y un tracto altamente polimórfico en el D-Loop, en la región hipervariable II, estas mutaciones se asociaron a la infección por VPH (Sharma et al, 2005), se propone que la mayoría de estas mutaciones son homoplasmicas convirtiéndose en mutaciones dominantes en las células tumorales, por lo que el hallazgo de las mismas podrían constituir un marcador molecular en la detección de algunos tipos de cáncer (Fliss et al, 2000).

## II. JUSTIFICACIÓN

En México, la principal causa de muerte de mujeres entre los 25 y los 60 años es por tumores malignos, el número uno es el cáncer cervical (INEGI, 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a México como el país de mayor mortalidad de CaCu con una tasa de 16 mujeres por cada 100,000 cada año. Hoy en día, el cáncer cervicouterino es una causa importante de mortalidad en las mujeres a nivel mundial a pesar de ser la neoplasia con el mayor potencial demostrado de prevención secundaria. Esta enfermedad es totalmente prevenible y curable en etapas tempranas de detección.

A pesar de los esfuerzos realizados en nuestro país para promover las campañas de información y detección, las tasas de incidencia y mortalidad no disminuyen de manera considerable. La investigación científica juega un papel muy importante para tratar de explicar la oncogenicidad de los tipos virales que afectan a nuestra población y en la comprensión de los procesos mediante los cuáles las mujeres infectadas por ciertos VPH evolucionan hasta cáncer cervical.

Es por ello que este trabajo pretende encontrar una asociación entre los polimorfismos en el DNA mitocondrial y los tipos virales de papiloma más frecuentes en la población mexicana, que pudieran aportar herramientas útiles para un diagnóstico temprano.

## II. JUSTIFICACIÓN

En México, la principal causa de muerte de mujeres entre los 25 y los 60 años es por tumores malignos, el número uno es el cáncer cervical (INEGI, 2006). La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró a México como el país de mayor mortalidad de CaCu con una tasa de 16 mujeres por cada 100,000 cada año. Hoy en día, el cáncer cervicouterino es una causa importante de mortalidad en las mujeres a nivel mundial a pesar de ser la neoplasia con el mayor potencial demostrado de prevención secundaria. Esta enfermedad es totalmente prevenible y curable en etapas tempranas de detección.

A pesar de los esfuerzos realizados en nuestro país para promover las campañas de información y detección, las tasas de incidencia y mortalidad no disminuyen de manera considerable. La investigación científica juega un papel muy importante para tratar de explicar la oncogenicidad de los tipos virales que afectan a nuestra población y en la comprensión de los procesos mediante los cuáles las mujeres infectadas por ciertos VPH evolucionan hasta cáncer cervical.

Es por ello que este trabajo pretende encontrar una asociación entre los polimorfismos en el DNA mitocondrial y los tipos virales de papiloma más frecuentes en la población mexicana, que pudieran aportar herramientas útiles para un diagnóstico temprano.

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### **Objetivo General:**

Identificar el polimorfismo en el DNA mitocondrial en la región D-loop y su asociación a los virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino.

#### **Objetivos Particulares:**

- Identificar los tipos virales de papiloma humano en las mujeres con cáncer cervical.
- Identificar los haplotipos del genoma humano mitocondrial en mujeres infectadas con algún tipo de virus del papiloma humano con cáncer cervical.
- Identificar la asociación entre las diferencias genéticas y los tipos de VPH más frecuentes que infectan a las mujeres con CaCu en México.

#### **Hipótesis:**

Existen marcadores genéticos mitocondriales asociados al riesgo de adquirir la infección por los tipos de VPH más frecuentes en la población mexicana.

### III. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### **Objetivo General:**

Identificar el polimorfismo en el DNA mitocondrial en la región D-loop y su asociación a los virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino.

#### **Objetivos Particulares:**

- Identificar los tipos virales de papiloma humano en las mujeres con cáncer cervical.
- Identificar los haplotipos del genoma humano mitocondrial en mujeres infectadas con algún tipo de virus del papiloma humano con cáncer cervical.
- Identificar la asociación entre las diferencias genéticas y los tipos de VPH más frecuentes que infectan a las mujeres con CaCu en México.

#### **Hipótesis:**

Existen marcadores genéticos mitocondriales asociados al riesgo de adquirir la infección por los tipos de VPH más frecuentes en la población mexicana.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El objetivo de este estudio fue determinar si existía una asociación entre la infección por los tipos de VPH y los polimorfismos del ADNm humano. Para ello fue necesario tipificar los diferentes VPH en 223 mujeres con CaCU, y la asignación de haplotipos mitocondriales de las mismas 223 mujeres para determinar las asociaciones.

**1. Recolección de muestras:** Para este estudio participaron mujeres entre 25 y 80 años que acudieron al servicio de Oncología del Hospital General de México SSA, entre diciembre del 2003 y abril del 2005, las pacientes fueron referidas debido a un diagnóstico previo de cáncer cervical, vulvar, vaginal, ovárico u otro, del servicio de Ginecología de este hospital o de otras instituciones de salud pública. Se incluyeron mujeres con diagnóstico de CaCU por el médico especialista a las que se les explicó el proyecto de investigación en el cual participarían, firmaron una carta de consentimiento donde se explicaba que el uso del material genético de las pacientes sería utilizado únicamente con fines de investigación para identificar alteraciones genéticas y la presencia del VPH así como una breve descripción de las muestras que se tomarían (Apéndice 1).

Se realizaron 2 citologías cervicales con un cepillo vaginal y se colectaron en tubos eppendorf (2 ml) con 1 ml de PBS (Solución Salina de Fosfatos pH= 8.0), las citologías colectadas se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Se extrajeron 2 biopsias tumorales con pinza de Kevorkian y se colocaron en tubos eppendorf (2 ml), las biopsias colectadas se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Se tomaron 10 ml de sangre periférica en tubo vacutainer con EDTA, los tubos con sangre se procesaron de inmediato para realizar la separación del plasma y los linfocitos, estos componentes se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

**Separación de Linfocitos:** Se realizó por la técnica de Percoll, la cual consiste en mezclar la sangre con metrizoato de sodio y polisacárido (Lymphoprep ®), incrementando la velocidad de sedimentación de los eritrocitos sin afectar la sedimentación de los leucocitos, formando un gradiente de concentración, lo que permite la separación de los leucocitos.



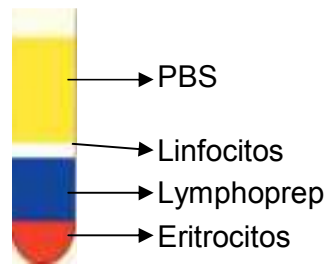


Fig. 13: Gradiente de densidad para la separación de linfocitos.

**2. Extracción del DNA:** Se realizó con el kit Qiagen DNeasy® Tissue el cual se basa en la cromatografía de adsorción cuyo fundamento es la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas, cuando el ADN está en una solución acuosa se encuentra cubierto de una capa de moléculas de agua que mantienen su solubilidad en estas soluciones, al adicionar iones caotrópicos al ADN, se destruye esta capa de moléculas de agua, por lo que las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del ADN. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, el ADN se une a la membrana de sílica gel de las columnas, mientras que las proteínas y otros contaminantes no se unen, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante el lavado. Posteriormente, el ADN se eluye de la membrana mediante soluciones tampón de elusión con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos), ya que permiten recuperar la capa hidrofílica alrededor del ADN, liberándolos de la membrana. Para el Kit de Qiagen DNeasy® Tissue el primer paso se realiza con proteinasa K, que es una enzima proteolítica, y la solución AL que ayuda a lisar membranas celulares permitiendo la salida del material genético, posteriormente se adiciona una solución con alta concentración de sales caotrópicas (AW1), principalmente cloruro de guanidina, en este paso el ADN se une con alta afinidad a la membrana de sílica gel y los contaminantes se eluyen, la siguiente solución (AW2) está compuesta principalmente de azida de sodio a bajas concentraciones, el ADN permanece unido a la membrana, el siguiente paso es la elusión del ADN mediante una solución ligeramente alcalina pH=8.0 (AE) que contiene Tris-EDTA, la cual arrastra al DNA de la membrana para colectarlo purificado.

Para la detección y tipificación de VPH la extracción del ADN se realizó de las citologías cervicales y para el ADN mitocondrial se extrajo a partir de los linfocitos.

**3. Amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa):** El fundamento de la PCR es la complementariedad de bases del DNA, se emplean 3 temperaturas: 1) Temperatura de desnaturalización en la cual se separan las hebras, 2) Temperatura de hibridación de los oligonucleótidos, 3) Temperatura de polimerización, donde se lleva a cabo la elongación de la cadena.

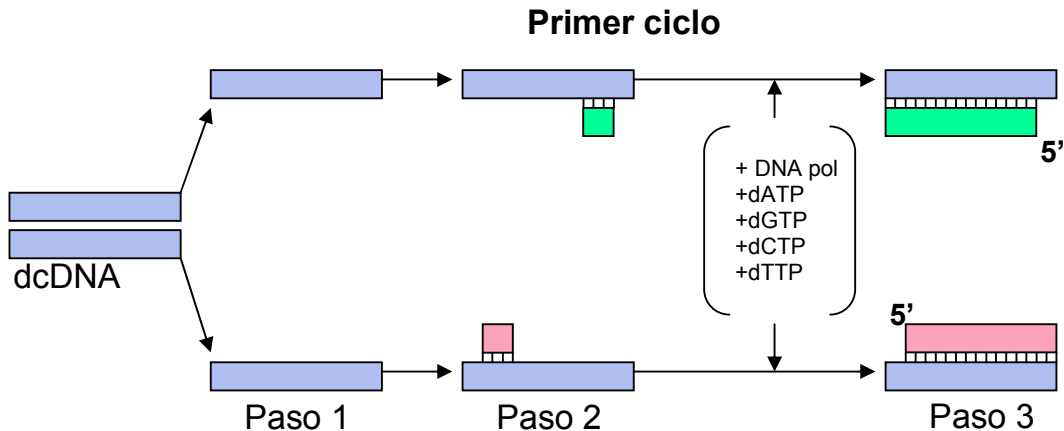


Fig. 14: Reacción en cadena de la polimerasa: Paso 1: Calentamiento para la separación de las cadenas de DNA. Paso 2: Hibridación de los oligonucleótidos. Paso 3: Síntesis de DNA a partir

En cada ciclo se duplica la cantidad de DNA sintetizada, cada nuevo fragmento sirve como templado para la siguiente cadena, luego de varios ciclos el producto predominante son fragmentos de DNA del tamaño correspondiente a la distancia entre el par de oligonucleótidos. (Molecular Biology of the cell 4th Ed, pp. 508-509). Para llevar a cabo la PCR se requieren oligonucleótidos, que son pequeños fragmentos de DNA (15-25 pb) que proporcionan un extremo 3'-OH libre para que la enzima Taq polimerasa pueda elongar la cadena colocando los dideoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) correspondientes, el  $MgCl_2$  es un cofactor de la enzima, y se adiciona además una solución amortiguadora para controlar el pH y la fuerza iónica durante la reacción.

Para la tipificación de VPH se amplificaron 3 regiones localizadas en el gen L1 del virus, denominadas L1C1, MY y GP, con oligonucleótidos previamente reportados (Ver tabla 4 y Figura 15), además de la región  $\beta$ -globina como un control de la calidad del material genético de partida.

Tabla: 4

Nombre oligo	Secuencia	Localización	Región	Tamaño (pb)
P13 P14	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' 5'-CCACTTGACCTACTTCAAC-3'	5203130-5203150 5203360-5203380	$\beta$ -globina	250
MY/11 MY/09	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3' 5'-CTAGTCAWAGGRRAMCCTGC-3'	6582-6601 7033-7013	MY	451
GP 5+ GP 6+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC-3' 5'-CTYATACTAAATGTCAAATAAAAAG-3'	6624-6646 6765-6741	GP	141
L1 L2	5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTTT-3' 5'-GTTATGTCTCATAAATCCCAT-3'	5609-5632 5861-5841	L1	252

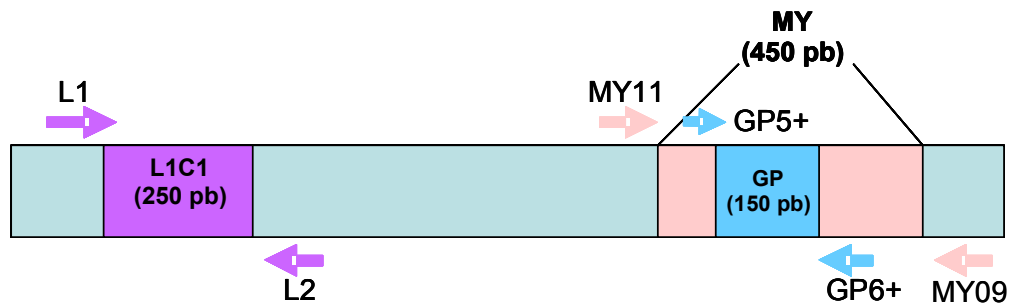


Fig. 15: Mapa de oligonucleótidos en el gen L1 de los VPH

La mezcla de reacción para la  $\beta$ -globina se preparó con una concentración final de 25 mM de solución amortiguadora, 2.0 mM de cloruro de magnesio, 200  $\mu$ M de dNTP's, 1 $\mu$ M de cada oligonucleótido, 0.5U de enzima Taq polimerasa y 500 ng de DNA en un volumen total de 25  $\mu$ L. Para las demás regiones solo cambió la concentración de cloruro de magnesio, para la región MY 2.0 mM de  $MgCl_2$ , para L1C1 3.0 mM de  $MgCl_2$  y para GP 3.5 mM de  $MgCl_2$  y para la región GP 1U de enzima.

Como control positivo se utilizó una mezcla de muestras positivas para VPH 16, como control negativo de la PCR, se utilizó una mezcla de reacción con todos los componentes y agua estéril en vez de DNA, como control negativo desde la extracción del DNA una mezcla de reacción con todos los componentes y PBS en vez de DNA.

Ciclajes: Tabla 5

<b>β-globina y MY</b>	<b>GP</b>	<b>L1C1</b>
94°C - 2:30 min	94°C - 5:00 min	94°C - 2:30 min
40 ciclos	40 ciclos	40 ciclos
94°C - 0:30 min	94°C - 1:00 min	94°C - 0:30 min
55°C - 0:30 min	40°C - 2:00 min	45°C - 0:30 min
72°C - 0:30 min	72°C - 1:30 min	72°C - 0:30 min
72°C - 5:00 min	72°C - 4:00 min	72°C - 5:00 min

Para la amplificación de la región D-Loop del mDNA utilizaron oligonucleótidos diseñados en nuestro laboratorio mediante el software de Primer Express (Ver tabla 6 y Figura 16).

Tabla: 6

Oligo	Secuencia	Localización	Región
L15926	'-ATACACCAGTCTTGTAACC-3'	15926-15945	D-Loop
H00580	'-TTGAGGAGGTAAGCTACATA-3'	580-561	
L00015	'-CACCTATTAACCACTCACG-3'	15-34	HV-II

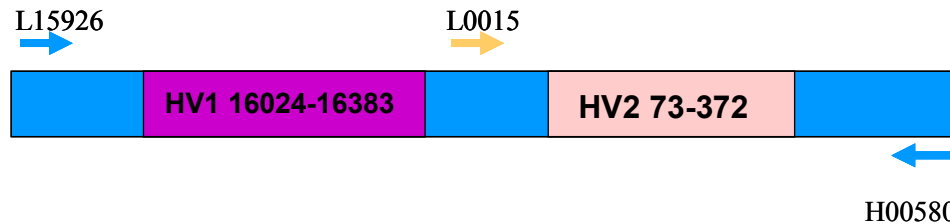


Fig. 16: Mapa de oligonucleótidos para la amplificación de la región D-Loop del mDNA. En flechas azules se señalan los oligonucleotidos para amplificar la región D-Loop, con la flecha amarilla se señala el oligonucleotido utilizado para secuenciar la RH II.

La mezcla de reacción de PCR se preparó a una concentración final de 25 mM de solución reguladora, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200μM de dNTP's, 1μM de cada oligonucleótido, 0.5 U de enzima y 500 ng de DNA. Como control positivo se utilizó DNA de placenta, un control negativo de la PCR, y un control negativo de la extracción de DNA.

Ciclaje:

<b>D-LOOP</b>
94°C – 2:00 min
32 ciclos
94°C - 0:45 min
60°C - 1:00 min
72°C - 2:00 min
72°C - 7:00 min

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer 9600.

Los fragmentos de DNA obtenidos de la PCR se visualizaron por medio de un gel de agarosa al 2%, para tipificación y al 1% para ADNm, teñido con bromuro de etidio y revelado con luz UV (ultravioleta). El marcador de peso molecular fue de 1Kb plus de Invitrogen MR.

**4. Purificación del DNA:** Luego del corrimiento electroforético del fragmento de ADN amplificado por PCR se realiza la purificación por medio del kit de QIAGEN MR, el fundamento de esta purificación se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva del ADN a partículas de sílica-gel en presencia de altas concentraciones de sales. La posterior elusión del ADN se realiza con una solución baja en sales o con agua. Para la solubilización de la agarosa se emplea la solución QX 1, la cuál contiene una alta concentración de sales caotrópicas lo que ocasiona la ruptura de los puentes de hidrógeno entre los azúcares del polímero, además de disociar la unión de proteínas de unión al ADN. Para la adsorción del ADN se emplea el reactivo QIAEX II y es dependiente de la concentración de sales y del pH, cuando existe un ambiente aniónico, el ADN es adsorbido por las partículas de sílica-gel, la adsorción se ve beneficiada a pH entre 6.0 - 7.5

Se realiza un lavado con el reactivo QX I para remover residuos de agarosa, posteriormente lavados con el reactivo PE remueve las sales y otras impurezas. Las partículas de sílica-gel y el ADN unido se secan a temperatura ambiente para remover el etanol residual, el cuál puede interferir en reacciones enzimáticas subsecuentes. La elusión eficiente del ADN se realiza a bajas concentraciones de sales y a un pH de 8.0 - 8.5, normalmente la elusión del ADN se realiza con TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM,

pH=8.0), Luego de la elusión, se centrifuga la muestra para que las partículas de sílica-gel se precipiten, el sobrenadante contiene entonces, el ADN limpio.

5. **Secuenciación:** Se realizó mediante secuenciación automatizada que se basa en el uso de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) marcados con diferentes fluoróforos, las reacciones de síntesis de cada base se realizan en un mismo tubo y los productos se separan por tamaño a lo largo de una electroforesis capilar, un detector lee y registra la señal de cada dideoxinucleótido marcado con su fluoróforo correspondiente, finalmente una computadora guarda la información de la secuencia nucleotídica y del electroferograma obtenido. Los fluoróforos son moléculas que emiten fluorescencia cuando se exponen a la luz UV de una longitud de onda específica. Algunos de ellos son: fluoresceína, que fluoresce verde pálido expuesta a 494 nm; la rodamina, que fluoresce rojo expuesta a 555 nm; el ácido aminometilcumarínico, que fluoresce azul expuesto a 399 nm.

La migración electroforética de las cadenas marcadas con ddNTP en el gel de los capilares pasa frente a un rayo láser enfocado a una posición fija. El láser induce una señal fluorescente dependiente del fluoróforo empleado específicamente, que representa cada uno de los cuatro nucleótidos. La secuencia es leída y registrada como picos alternantes de cada uno de los colores, lo que representa la alternancia de los nucleótidos en la secuencia (Passarge 2da Ed. Pp. 52-55).



Fig. 17: Secuenciador automatizado Applied Biosystem

La mezcla de reacción que se emplea es del Kit comercial de ABI PRISM se utiliza el reactivo Big Dye Terminador RR V3.0, el cual contiene Tris-HCl 1mM y los dideoxinucleotidos( ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP), además se agrega el

oligonucleótido para secuenciar dependiendo de la región y el ADN purificado correspondiente.

Ciclaje:

<b>Rx de Secuencia</b>
94°C - 5:00 min
25 ciclos
94°C - 0:45 min
60°C - 1 :00min
72°C - 2 :00min
4°C - ∞

Para la tipificación de VPH se emplearon los mismos oligonucleotidos utilizados en la PCR (MY11/MY09, GP5+/GP6+, L1/L2), y se secuenció la mejor banda amplificada. Para el ADNm se secuenció la región hipervariable II con el oligonucleótido L00015. (Ver figura 16

El equipo es un secuenciador es un ABI Prism 3000.

- 6. Análisis de las secuencias:** La secuencia viral obtenida se envió a la base de datos de FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>), esta base de datos compara la secuencia en cuestión con una base de datos que incluye secuencias virales, de la comparación se obtienen los resultados del tipo viral y la homología encontrada. Es importante mencionar que para determinar los tipos virales se requieren homologías mayores al 90%.

Para el análisis de las secuencias del ADNm se realizó una comparación entre la secuencia obtenida de cada muestra y la secuencia de referencia de Anderson (Gen Bank: J01415), posteriormente se determinaron los polimorfismos, y se les asignó un haplotipo a cada conjunto de polimorfismos. La SRC fue la primera secuencia completa del ADNm humano, ésta se realizó en la Universidad de Cambridge por el Dr. Anderson y colaboradores en 1981 y corresponde a la secuencia de un varón caucásico. Por ser la primera secuencia del ADNm es reconocida mundialmente como la secuencia de referencia por lo que los cambios observados en cualquier estudio en la secuencia del ADNm humano se reportan en comparación con ésta.

La clave para denominar los haplotipos encontrados se asignó de acuerdo al número de SNP's (Polimorfismo de un solo nucleótido) y a las regiones microsatélites. La letra H denomina haplotipo, el número siguiente denomina los SNP's identificados, la letra se asigna en orden alfabético para poder nombrar todos los haplotipos que tengan el número de SNP's descrito , luego se asignaron tres números que corresponden a la descripción del número de nucleótidos que tiene cada región microsatélite. Por ejemplo, si una muestra presenta 5 SNP's, 6 adeninas en la región 286, 8 citocinas en la región 303 y 6 citocinas en la región 315 entonces se denominaba de la siguiente manera: H5A.686.



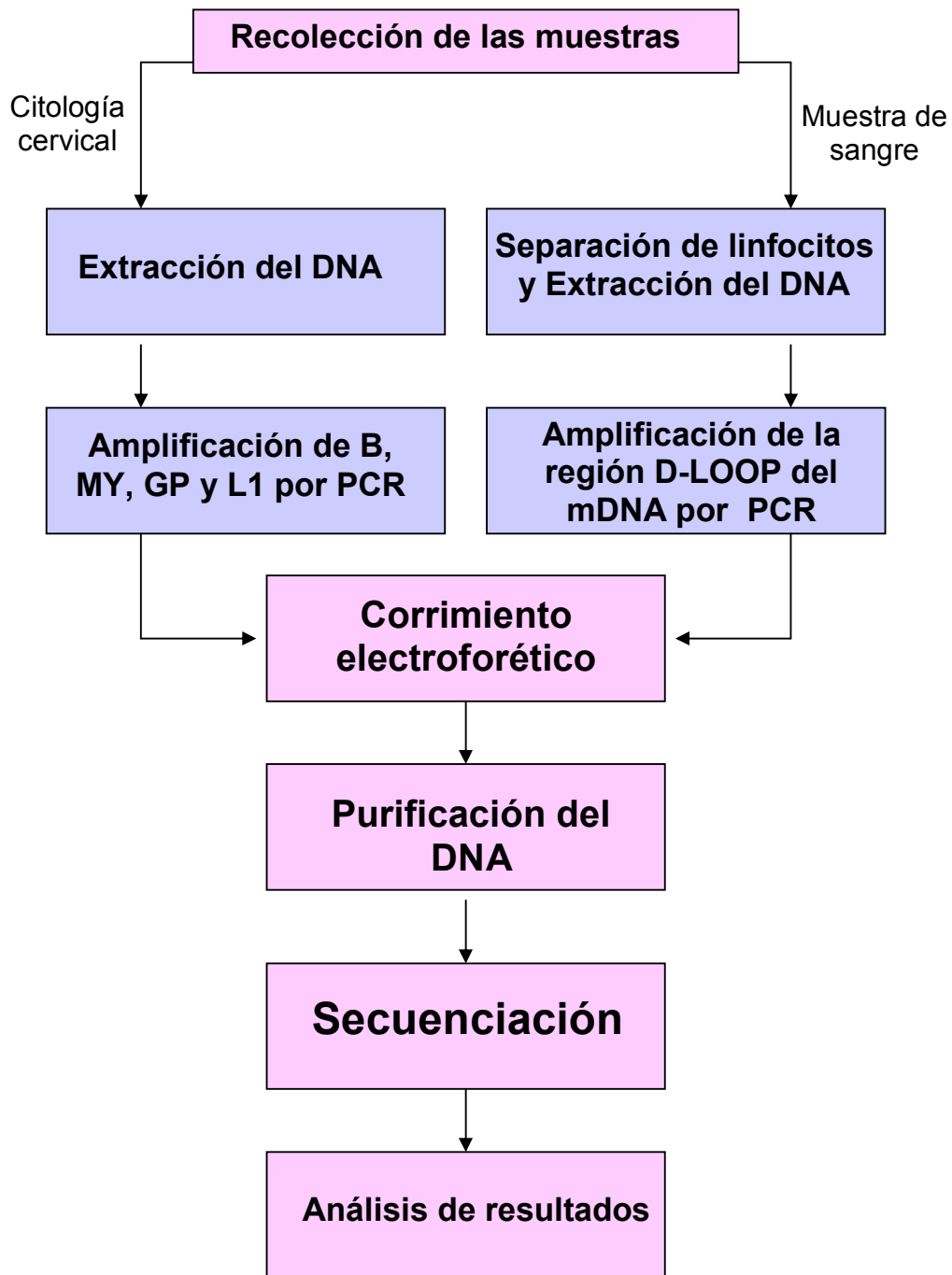


Fig. 18: Diagrama de flujo general

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

El objetivo de este estudio fue determinar si existía una asociación entre la infección por los tipos de VPH y los polimorfismos del ADNm humano. Para ello fue necesario tipificar los diferentes VPH en 223 mujeres con CaCU, y la asignación de haplotipos mitocondriales de las mismas 223 mujeres para determinar las asociaciones.

**1. Recolección de muestras:** Para este estudio participaron mujeres entre 25 y 80 años que acudieron al servicio de Oncología del Hospital General de México SSA, entre diciembre del 2003 y abril del 2005, las pacientes fueron referidas debido a un diagnóstico previo de cáncer cervical, vulvar, vaginal, ovárico u otro, del servicio de Ginecología de este hospital o de otras instituciones de salud pública. Se incluyeron mujeres con diagnóstico de CaCU por el médico especialista a las que se les explicó el proyecto de investigación en el cual participarían, firmaron una carta de consentimiento donde se explicaba que el uso del material genético de las pacientes sería utilizado únicamente con fines de investigación para identificar alteraciones genéticas y la presencia del VPH así como una breve descripción de las muestras que se tomarían (Apéndice 1).

Se realizaron 2 citologías cervicales con un cepillo vaginal y se colectaron en tubos eppendorf (2 ml) con 1 ml de PBS (Solución Salina de Fosfatos pH= 8.0), las citologías colectadas se almacenaron a -20°C hasta su procesamiento. Se extrajeron 2 biopsias tumorales con pinza de Kevorkian y se colocaron en tubos eppendorf (2 ml), las biopsias colectadas se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento. Se tomaron 10 ml de sangre periférica en tubo vacutainer con EDTA, los tubos con sangre se procesaron de inmediato para realizar la separación del plasma y los linfocitos, estos componentes se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

**Separación de Linfocitos:** Se realizó por la técnica de Percoll, la cual consiste en mezclar la sangre con metrizoato de sodio y polisacárido (Lymphoprep ®), incrementando la velocidad de sedimentación de los eritrocitos sin afectar la sedimentación de los leucocitos, formando un gradiente de concentración, lo que permite la separación de los leucocitos.

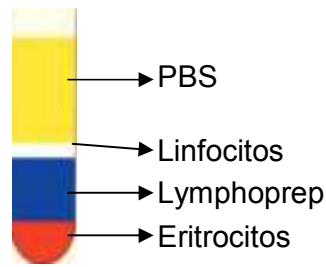


Fig. 13: Gradiente de densidad para la separación de linfocitos.

**2. Extracción del DNA:** Se realizó con el kit Qiagen DNeasy® Tissue el cual se basa en la cromatografía de adsorción cuyo fundamento es la adsorción y desorción de los ácidos nucleicos en presencia de sales caotrópicas, cuando el ADN está en una solución acuosa se encuentra cubierto de una capa de moléculas de agua que mantienen su solubilidad en estas soluciones, al adicionar iones caotrópicos al ADN, se destruye esta capa de moléculas de agua, por lo que las sales caotrópicas crean un entorno hidrofóbico alrededor del ADN. Bajo estas condiciones hidrofóbicas, el ADN se une a la membrana de sílica gel de las columnas, mientras que las proteínas y otros contaminantes no se unen, por lo tanto, son eliminados de la muestra durante el lavado. Posteriormente, el ADN se eluye de la membrana mediante soluciones tampón de elusión con baja concentración de sales (ligeramente alcalinos), ya que permiten recuperar la capa hidrofílica alrededor del ADN, liberándolos de la membrana. Para el Kit de Qiagen DNeasy® Tissue el primer paso se realiza con proteinasa K, que es una enzima proteolítica, y la solución AL que ayuda a lisar membranas celulares permitiendo la salida del material genético, posteriormente se adiciona una solución con alta concentración de sales caotrópicas (AW1), principalmente cloruro de guanidina, en este paso el ADN se une con alta afinidad a la membrana de sílica gel y los contaminantes se eluyen, la siguiente solución (AW2) está compuesta principalmente de azida de sodio a bajas concentraciones, el ADN permanece unido a la membrana, el siguiente paso es la elusión del ADN mediante una solución ligeramente alcalina pH=8.0 (AE) que contiene Tris-EDTA, la cual arrastra al DNA de la membrana para colectarlo purificado.

Para la detección y tipificación de VPH la extracción del ADN se realizó de las citologías cervicales y para el ADN mitocondrial se extrajo a partir de los linfocitos.

**3. Amplificación por PCR (Reacción en cadena de la polimerasa):** El fundamento de la PCR es la complementariedad de bases del DNA, se emplean 3 temperaturas: 1) Temperatura de desnaturalización en la cual se separan las hebras, 2) Temperatura de hibridación de los oligonucleótidos, 3) Temperatura de polimerización, donde se lleva a cabo la elongación de la cadena.

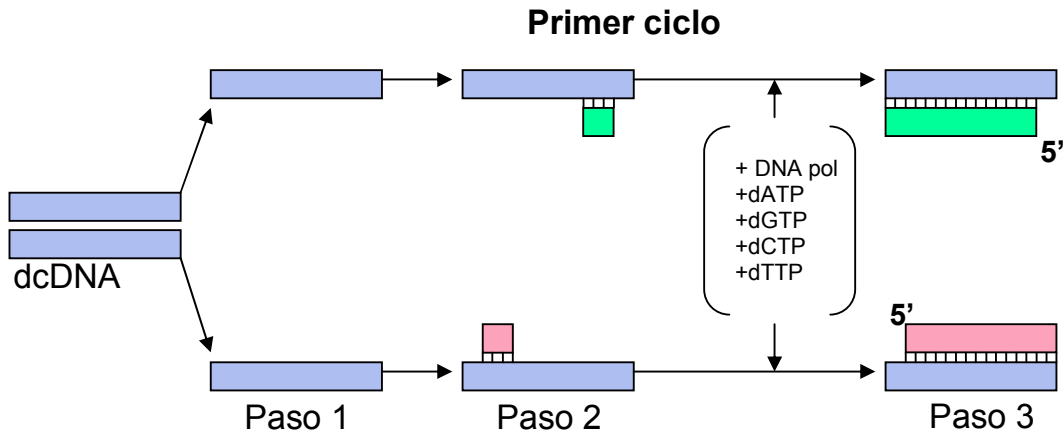


Fig. 14: Reacción en cadena de la polimerasa: Paso 1: Calentamiento para la separación de las cadenas de DNA. Paso 2: Hibridación de los oligonucleótidos. Paso 3: Síntesis de DNA a partir

En cada ciclo se duplica la cantidad de DNA sintetizada, cada nuevo fragmento sirve como templado para la siguiente cadena, luego de varios ciclos el producto predominante son fragmentos de DNA del tamaño correspondiente a la distancia entre el par de oligonucleótidos. (Molecular Biology of the cell 4th Ed, pp. 508-509). Para llevar a cabo la PCR se requieren oligonucleótidos, que son pequeños fragmentos de DNA (15-25 pb) que proporcionan un extremo 3'-OH libre para que la enzima Taq polimerasa pueda elongar la cadena colocando los dideoxinucleótidos (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) correspondientes, el  $MgCl_2$  es un cofactor de la enzima, y se adiciona además una solución amortiguadora para controlar el pH y la fuerza iónica durante la reacción.

Para la tipificación de VPH se amplificaron 3 regiones localizadas en el gen L1 del virus, denominadas L1C1, MY y GP, con oligonucleótidos previamente reportados (Ver tabla 4 y Figura 15), además de la región  $\beta$ -globina como un control de la calidad del material genético de partida.

Tabla: 4

Nombre oligo	Secuencia	Localización	Región	Tamaño (pb)
P13 P14	5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3' 5'-CCACTTGACCTACTTCAAC-3'	5203130-5203150 5203360-5203380	$\beta$ -globina	250
MY/11 MY/09	5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3' 5'-CTAGTCAWAGGRRAMCCTGC-3'	6582-6601 7033-7013	MY	451
GP 5+ GP 6+	5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC-3' 5'-CTYATACTAAATGTCAAATAAAAAG-3'	6624-6646 6765-6741	GP	141
L1 L2	5'-CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTTT-3' 5'-GTTATGTCTCATAAATCCCAT-3'	5609-5632 5861-5841	L1	252

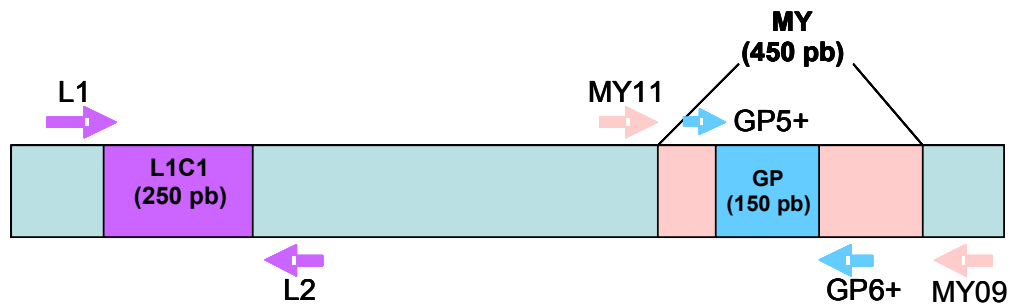


Fig. 15: Mapa de oligonucleótidos en el gen L1 de los VPH

La mezcla de reacción para la  $\beta$ -globina se preparó con una concentración final de 25 mM de solución amortiguadora, 2.0 mM de cloruro de magnesio, 200  $\mu$ M de dNTP's, 1 $\mu$ M de cada oligonucleótido, 0.5U de enzima Taq polimerasa y 500 ng de DNA en un volumen total de 25  $\mu$ L. Para las demás regiones solo cambió la concentración de cloruro de magnesio, para la región MY 2.0 mM de  $MgCl_2$ , para L1C1 3.0 mM de  $MgCl_2$  y para GP 3.5 mM de  $MgCl_2$  y para la región GP 1U de enzima.

Como control positivo se utilizó una mezcla de muestras positivas para VPH 16, como control negativo de la PCR, se utilizó una mezcla de reacción con todos los componentes y agua estéril en vez de DNA, como control negativo desde la extracción del DNA una mezcla de reacción con todos los componentes y PBS en vez de DNA.

Ciclajes: Tabla 5

<b>β-globina y MY</b>	<b>GP</b>	<b>L1C1</b>
94°C - 2:30 min	94°C - 5:00 min	94°C - 2:30 min
40 ciclos	40 ciclos	40 ciclos
94°C - 0:30 min	94°C - 1:00 min	94°C - 0:30 min
55°C - 0:30 min	40°C - 2:00 min	45°C - 0:30 min
72°C - 0:30 min	72°C - 1:30 min	72°C - 0:30 min
72°C - 5:00 min	72°C - 4:00 min	72°C - 5:00 min

Para la amplificación de la región D-Loop del mDNA utilizaron oligonucleótidos diseñados en nuestro laboratorio mediante el software de Primer Express (Ver tabla 6 y Figura 16).

Tabla: 6

Oligo	Secuencia	Localización	Región
L15926	'-ATACACCAGTCTTGTAACCC-3'	15926-15945	D-Loop
H00580	'-TTGAGGAGGTAAGCTACATA-3'	580-561	
L00015	'-CACCCCTATTAACCACTCACG-3'	15-34	HV-II

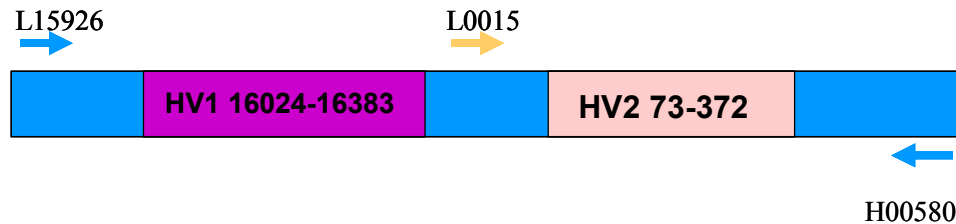


Fig. 16: Mapa de oligonucleótidos para la amplificación de la región D-Loop del mDNA. En flechas azules se señalan los oligonucleotidos para amplificar la región D-Loop, con la flecha amarilla se señala el oligonucleotido utilizado para secuenciar la RH II.

La mezcla de reacción de PCR se preparó a una concentración final de 25 mM de solución reguladora, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200μM de dNTP's, 1μM de cada oligonucleótido, 0.5 U de enzima y 500 ng de DNA. Como control positivo se utilizó DNA de placenta, un control negativo de la PCR, y un control negativo de la extracción de DNA.

Ciclaje:

<b>D-LOOP</b>
94°C – 2:00 min
32 ciclos
94°C - 0:45 min
60°C - 1:00 min
72°C - 2:00 min
72°C - 7:00 min

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Perkin Elmer 9600.

Los fragmentos de DNA obtenidos de la PCR se visualizaron por medio de un gel de agarosa al 2%, para tipificación y al 1% para ADNm, teñido con bromuro de etidio y revelado con luz UV (ultravioleta). El marcador de peso molecular fue de 1Kb plus de Invitrogen MR.

**4. Purificación del DNA:** Luego del corrimiento electroforético del fragmento de ADN amplificado por PCR se realiza la purificación por medio del kit de QIAGEN MR, el fundamento de esta purificación se basa en la solubilización de la agarosa y la adsorción selectiva del ADN a partículas de sílica-gel en presencia de altas concentraciones de sales. La posterior elusión del ADN se realiza con una solución baja en sales o con agua. Para la solubilización de la agarosa se emplea la solución QX 1, la cuál contiene una alta concentración de sales caotrópicas lo que ocasiona la ruptura de los puentes de hidrógeno entre los azúcares del polímero, además de disociar la unión de proteínas de unión al ADN. Para la adsorción del ADN se emplea el reactivo QIAEX II y es dependiente de la concentración de sales y del pH, cuando existe un ambiente aniónico, el ADN es adsorbido por las partículas de sílica-gel, la adsorción se ve beneficiada a pH entre 6.0 - 7.5

Se realiza un lavado con el reactivo QX I para remover residuos de agarosa, posteriormente lavados con el reactivo PE remueve las sales y otras impurezas. Las partículas de sílica-gel y el ADN unido se secan a temperatura ambiente para remover el etanol residual, el cuál puede interferir en reacciones enzimáticas subsecuentes. La elusión eficiente del ADN se realiza a bajas concentraciones de sales y a un pH de 8.0 - 8.5, normalmente la elusión del ADN se realiza con TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM,

pH=8.0), Luego de la elusión, se centrifuga la muestra para que las partículas de sílica-gel se precipiten, el sobrenadante contiene entonces, el ADN limpio.

5. **Secuenciación:** Se realizó mediante secuenciación automatizada que se basa en el uso de dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) marcados con diferentes fluoróforos, las reacciones de síntesis de cada base se realizan en un mismo tubo y los productos se separan por tamaño a lo largo de una electroforesis capilar, un detector lee y registra la señal de cada dideoxinucleótido marcado con su fluoróforo correspondiente, finalmente una computadora guarda la información de la secuencia nucleotídica y del electroferograma obtenido. Los fluoróforos son moléculas que emiten fluorescencia cuando se exponen a la luz UV de una longitud de onda específica. Algunos de ellos son: fluoresceína, que fluoresce verde pálido expuesta a 494 nm; la rodamina, que fluoresce rojo expuesta a 555 nm; el ácido aminometilcumarínico, que fluoresce azul expuesto a 399 nm.

La migración electroforética de las cadenas marcadas con ddNTP en el gel de los capilares pasa frente a un rayo láser enfocado a una posición fija. El láser induce una señal fluorescente dependiente del fluoróforo empleado específicamente, que representa cada uno de los cuatro nucleótidos. La secuencia es leída y registrada como picos alternantes de cada uno de los colores, lo que representa la alternancia de los nucleótidos en la secuencia (Passarge 2da Ed. Pp. 52-55).



Fig. 17: Secuenciador automatizado Applied Biosystem

La mezcla de reacción que se emplea es del Kit comercial de ABI PRISM se utiliza el reactivo Big Dye Terminador RR V3.0, el cual contiene Tris-HCl 1mM y los dideoxinucleotidos( ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP), además se agrega el



oligonucleótido para secuenciar dependiendo de la región y el ADN purificado correspondiente.

Ciclaje:

<b>Rx de Secuencia</b>
94°C - 5:00 min
25 ciclos
94°C - 0:45 min
60°C - 1 :00min
72°C - 2 :00min
4°C - ∞

Para la tipificación de VPH se emplearon los mismos oligonucleotidos utilizados en la PCR (MY11/MY09, GP5+/GP6+, L1/L2), y se secuenció la mejor banda amplificada. Para el ADNm se secuenció la región hipervariable II con el oligonucleótido L00015. (Ver figura 16

El equipo es un secuenciador es un ABI Prism 3000.

- 6. Análisis de las secuencias:** La secuencia viral obtenida se envió a la base de datos de FASTA (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>), esta base de datos compara la secuencia en cuestión con una base de datos que incluye secuencias virales, de la comparación se obtienen los resultados del tipo viral y la homología encontrada. Es importante mencionar que para determinar los tipos virales se requieren homologías mayores al 90%.

Para el análisis de las secuencias del ADNm se realizó una comparación entre la secuencia obtenida de cada muestra y la secuencia de referencia de Anderson (Gen Bank: J01415), posteriormente se determinaron los polimorfismos, y se les asignó un haplotipo a cada conjunto de polimorfismos. La SRC fue la primera secuencia completa del ADNm humano, ésta se realizó en la Universidad de Cambridge por el Dr. Anderson y colaboradores en 1981 y corresponde a la secuencia de un varón caucásico. Por ser la primera secuencia del ADNm es reconocida mundialmente como la secuencia de referencia por lo que los cambios observados en cualquier estudio en la secuencia del ADNm humano se reportan en comparación con ésta.

La clave para denominar los haplotipos encontrados se asignó de acuerdo al número de SNP's (Polimorfismo de un solo nucleótido) y a las regiones microsatélites. La letra H denomina haplotipo, el número siguiente denomina los SNP's identificados, la letra se asigna en orden alfabético para poder nombrar todos los haplotipos que tengan el número de SNP's descrito , luego se asignaron tres números que corresponden a la descripción del número de nucleótidos que tiene cada región microsatélite. Por ejemplo, si una muestra presenta 5 SNP's, 6 adeninas en la región 286, 8 citocinas en la región 303 y 6 citocinas en la región 315 entonces se denominaba de la siguiente manera: H5A.686.

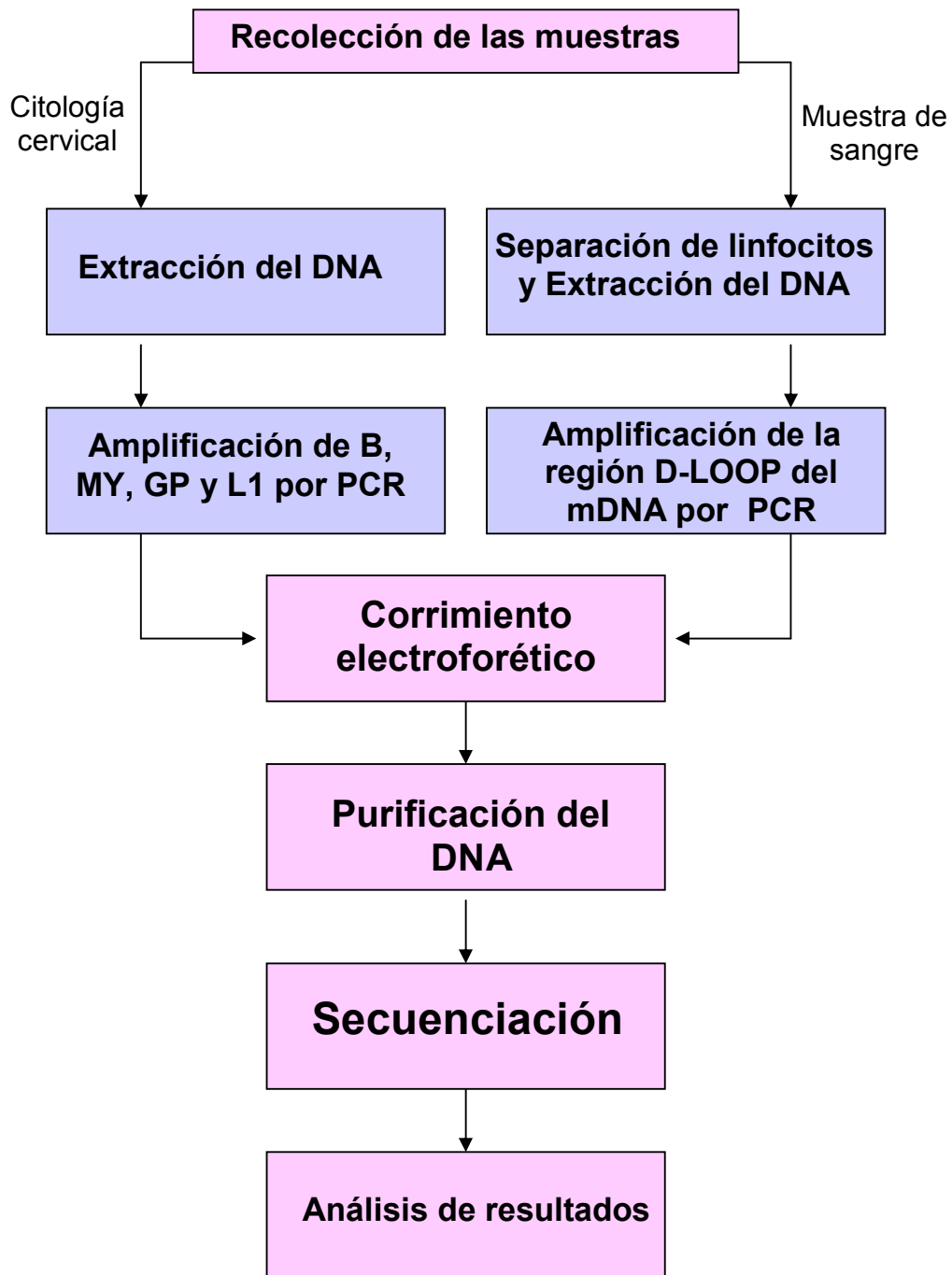


Fig. 18: Diagrama de flujo general

## V. RESULTADOS

**Detección y Tipificación del VPH:** De las 223 muestras analizadas el 96% fueron positivas para algún tipo de VPH. Se detectaron 21 tipos de VPH, de los cuales 15 tipos son de alto riesgo y 7 de bajo riesgo. Los VPH de alto riesgo más frecuentes fueron los siguientes: el tipo 16 (46.2%), el tipo 18 (14.8%), el tipo 45 (9.4%) y el tipo 31 (5.4%), los tipos de bajo riesgo detectados fueron los tipos 11, 32, 53, 61, 66 y 69 con una frecuencia en total de 4.5%. (Ver figura 19).

**Distribución de tipos de VPH detectados en mujeres con CaCU en México (n=223)**

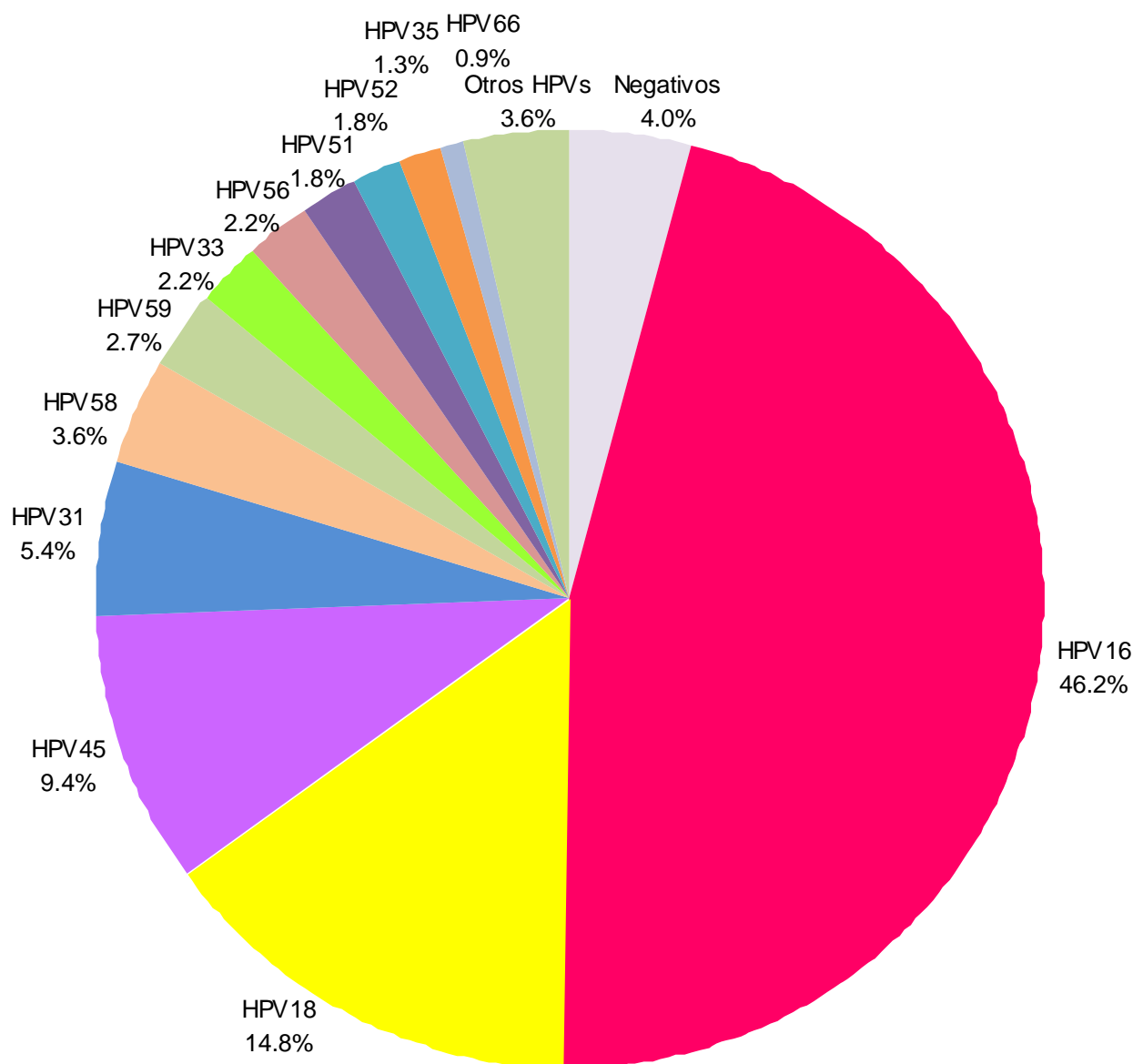


Fig. 19

Considerando los tipos virales de acuerdo a la clasificación filogenética de los mismos, los virus pertenecientes a la especie 9, encabezados por el tipo 16 son los más frecuentes detectándose en 60.5% de las muestras, seguidos por los virus pertenecientes a la especie 7, encabezados por el tipo 18 que se detectaron en 27.8% de las muestras, los virus pertenecientes a la familia 6 se detectaron en 3.4% y los virus pertenecientes a la familia 5 se detectaron en 2.3%. (Ver figura 21).

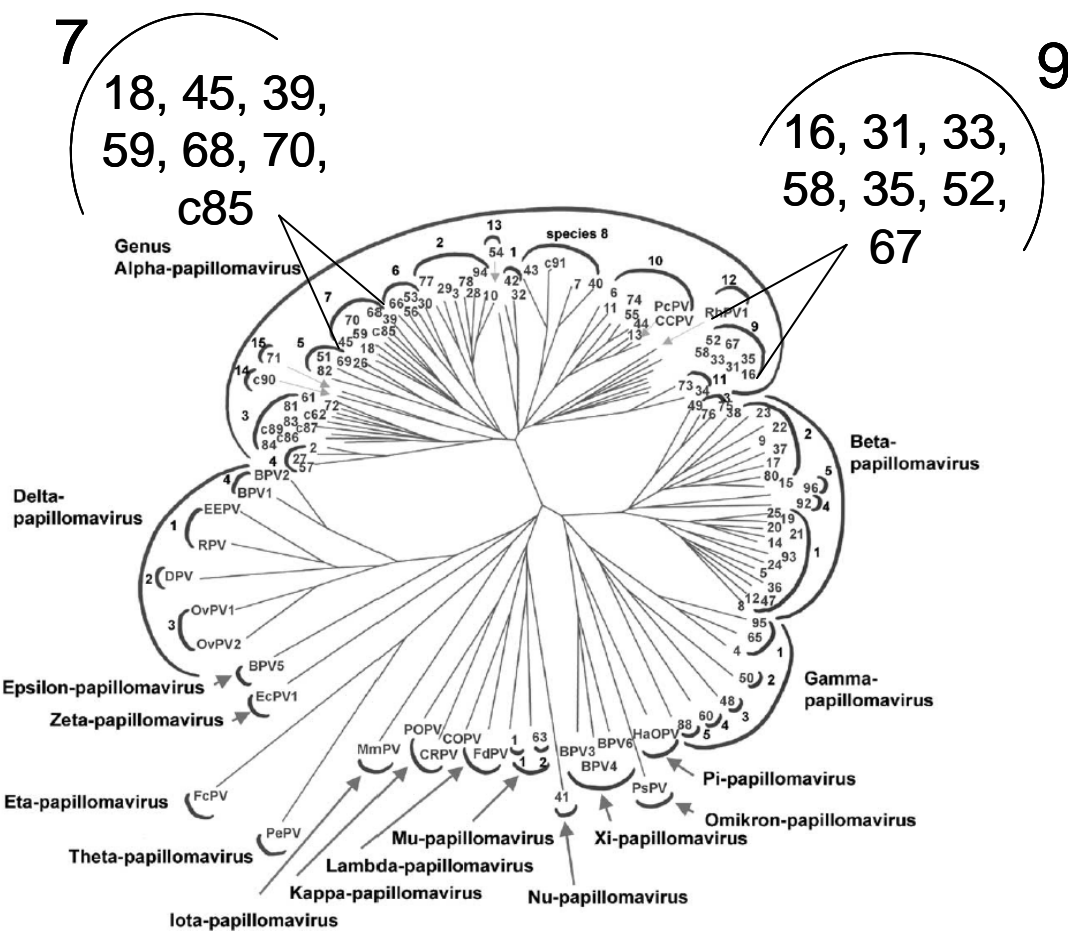


Fig. 21. Árbol filogenético de los VPH

**Polimorfismo en el ADN mitocondrial:** En el grupo de 223 mujeres con cáncer cervical exploradas, se encontraron 55 sitios polimórficos en la región hipervariable II del ADNm; 46 de estos sitios polimórficos fueron SNP's, 4 inserciones, una delección de seis nucleótidos y cuatro regiones microsatélites (Ver figura 24). Los SNP's son polimorfismos de un solo nucleótido que se presentan en mas del 1% de la población.

De los de los 46 SNP's presentes en las muestras exploradas se detectaron 37 transiciones, 6 transversiones y 3 trialélicos.

## mDNA Región Hipervariable II

73-340 (267 pb)

**Secuencia de referencia: ANDERSON**

```
ATGCACGCGATAGCATTGCGAGACGCTGGAGCCGGAGCACCC
T_ATGTCGCAGTATCTGTCTTTGATTCTGCCTCATCCTATTATT
TAT_CGCACCTACGTTCAATATTACAGGCGAACATACTTACTAA
AGTGTGTTAATTAATTAATGCTTGTAGGACATAATAATAACAAT
T_GAATGTCTGCACAGCCACTTTCCACACAGACATCATAACAA
AAAATTTCCACCAA_CCCCCC_TCCCC_GCTTCTGGCCAC
AGCACTTAAACAC
```

- SNP's
- Repetidos
- Deleciones
- Inserciones

Fig. 24: Posiciones variables en el ADNm en la región hipervariable II con respecto a la secuencia de Anderson

De los 46 SNP's detectados, los SNP's en la posición 263G y en la posición 73G fueron los polimorfismos más frecuentes encontrándose en el 100% y 98.6% de las muestras respectivamente, los SNP's que siguieron en frecuencia fueron, el SNP en la posición 146C que se encontró en 59.6%, el SNP en la posición 235G se encontró en 45.4%, el SNP en la posición 153G se encontró en 41.1%, el SNP en la posición 152C se encontró en 14.7%, estos últimos 4 SNP's son los que serán de utilidad para el estudio de asociación, otros SNP's se encontraron en la posición 195 C/A en 4% de las muestras, el SNP en la posición 204C se encontró en 2.8%, se encontraron 26 SNP's que tienen una frecuencia menor al 1.0% en las muestras exploradas.

La deleción de 6 nucleótidos en la posición 106-111 se encontró en una sola muestra. Las regiones microsatélite compuestas por adeninas se localizan en las posiciones 248-249 y

286-291, la secuencia de referencia presenta 2A y 6A respectivamente; se observó una relación directa entre estas dos regiones de adeninas, siempre que se deleta una adenina en la posición 249 (alelo 1A) se deletan 2 adeninas en la región de 286-291 (alelo 4A) .

En las muestras exploradas el 97.2% presenta los alelos 2A y 6A y solo el 2.8% presenta las deleciones descritas.

Las regiones microsatélite compuestas por citosinas se localizan en las posiciones 303-309 y 311-315, la secuencia de referencia presenta 7C y 5C respectivamente en esas posiciones. En las muestras exploradas, en la región 303-309 se encontraron 5C en una sola muestra que corresponde al 0.5%, 7C en una frecuencia de 24.5%, 8C con una frecuencia de 46.3% y 9C en una frecuencia de 25.0%. En la región de 311-315 la secuencia de referencia tiene 5C, en nuestras muestras se encontraron 6C en el 99.5% de los casos.

Se obtuvieron en total 100 haplotipos distintos, sin embargo sólo 11 de ellos se encontraron en 5 o más pacientes y sólo 5 haplotipos se encontraron en más de 10 pacientes, son los siguientes: el haplotipo H5A.686 (11.21%), el haplotipo H5A.676 (6.3%), el haplotipo H5A.696 (4.9%) y los haplotipos H2B.686 y H2B.696 se encontraron en la misma frecuencia (4.5%) (Ver tabla 7). Un total de 78 haplotipos se encontraron en una sola muestra. En la Tabla 7 se encuentran 26 haplotipos completos de los 78 que se encontraron en una sola muestra.





**Asociación de haplotipos mitocondriales y los tipos de VPH:** Para determinar una asociación entre los haplotipos mitocondriales y los tipos virales se compararon los 5 haplotipos más frecuentes en los tipos virales más comunes que son 16, 18, 45 y 31, (ver Tabla 8), se observó que las mujeres con haplotipos H5A.686, H5A.676 y H5A.696 se encuentran más frecuentemente infectadas por VPH 16 (52%, 43% y 64% respectivamente), mientras que las mujeres con haplotipo H2B.696 están infectadas más frecuentemente por VPH 18 (40%) y por VPH 16 (30%), las mujeres con haplotipo H2B.686 se encuentran infectadas por VPH 16 (40%) y con menor frecuencia en pacientes infectadas por VPH 45 (30%).

Tabla 8.

**Distribución de haplotipos frecuentes en los tipos virales más frecuentes.**

Haplotipo	N TOTAL	VPH 16		VPH 18		VPH 45		VPH 31	
		N	%	N	%	N	%	N	%
H5A.686	25	13	52	5	20	0	0	2	8
H5A.676	14	6	43	0	0	2	14	2	14
H5A.696	11	7	64	1	9	0	0	1	9.1
H2B.696	10	3	30	4	40	1	10	0	0
H2B.686	10	4	40	0	0	3	30	0	0
<b>Total</b>		33		10		6		5	

Se analizó la comparación entre el número de SNP's y los tipos virales más comunes (ver tabla 9), los resultados muestran que los haplotipos con 1 SNP presentan más frecuentemente infecciones por VPH 18 y las mujeres con haplotipos de 5SNP's se infectan más comúnmente por VPH 16.

Tabla 9.

**Distribución del número de SNP's en los tipos de VPH más frecuentes.**

No. SNP's	N TOTAL	VPH 16		VPH 18		VPH 45		VPH 31	
		N	%	N	%	N	%	N	%
1	5	1	20	2	40	0	0	0	0
2	47	18	38.3	10	21.28	7	14.8936	1	2.128
3	41	20	48.78	5	12.2	1	2.43902	2	4.878
4	35	16	45.71	6	17.14	5	14.2857	1	2.857
5	63	33	52.38	7	11.11	2	3.1746	6	9.524
6	22	10	45.45	3	13.64	5	22.7273	2	9.091
7	10	5	50	0	0	1	10	0	0
<b>Total</b>	223	103		33		21		12	

Sin embargo estos resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas.

Decidimos hacer la comparación entre los 5 haplotipos más comunes y los grupos de virus, los tipos 18, 45, 59 y 70 que pertenecen a la especie 7 (G7) y los tipos 16, 31, 33, 52 y 58 que pertenecen a la especie 9 (G9) (ver tabla 10). Se observó que las mujeres con haplotipos H5A.686, H5A.676 y H5A.696 están más frecuentemente infectadas con los tipos virales del grupo G9 (60%, 57% y 73% respectivamente), las mujeres con haplotipo H2B.696 están más frecuentemente infectadas con los tipos virales del grupo G7 (50%) y las mujeres con haplotipo H2B.686 están infectadas por el grupo G9 (40%) y por el grupo G7 (30%).

Tabla 10.

#### Distribución de haplotipos frecuentes en los grupos de virus G7 y G9.

	N TOTAL	G7		G9	
		N	%	N	%
<b>H5A.686</b>	25	5	20	15	60
<b>H5A.676</b>	14	2	14	8	57
<b>H5A.696</b>	11	1	9.1	8	73
<b>H2B.696</b>	10	5	50	3	30
<b>H2B.686</b>	10	3	30	4	40
<b>Total</b>	70	16		38	

El análisis comparativo de los haplotipos por su número de SNP's agrupando los tipos virales por especies, mostró que las mujeres con haplotipos de 2 SNP's están más frecuentemente infectadas con el grupo de virus G7 (26.2%). Las mujeres que presentan haplotipos de 5 SNP's están infectadas más frecuentemente con el grupo de virus G9 (32.4%) (ver tabla 11).

Tabla 11.

#### Distribución del número de SNP's en los en los grupos de virus G7 y G9.

No. Mutaciones	N TOTAL	G7		G9	
		N	%	N	%
<b>1</b>	5	3	4,9	1	0,7
<b>2</b>	47	16	26,2	25	18,4
<b>3</b>	41	11	18,0	26	19,1
<b>4</b>	35	12	19,7	20	14,7
<b>5<sup>a</sup></b>	63	10	16,4	44	32,4
<b>6</b>	22	8	13,1	13	9,6
<b>7</b>	10	1	1,6	7	5,1
<b>Total</b>		61		136	

a p=0,032, chi-cuadrada

Posteriormente analizamos la asociación de los grupos virales con los SNP's más frecuentes (146, 152, 153 y 235), a excepción de los SNP's 73G y 263G dado que estos se encuentran

en casi todas la población. El SNP 146T es más frecuente en el grupo G7 (70.5%) y el SNP 146C en el grupo G9 (64%), el SNP 153A es más frecuente en el grupo G7 (70.5%) y el SNP 153G es más frecuente en G9 (45.6%), el SNP 235A es más frecuente en G7 (72.1%) y el SNP 235G es más frecuente en G9 (47.8%). Todas las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas (ver tabla 12). Estas posiciones se encuentran en los haplotipos de 5 SNP's más comunes, es importante mencionar que estos haplotipos representan el 22.4% del total haplotipos encontrados en las muestras exploradas

Tabla 12

**Distribución de grupos de VPH por SNP's de la región hipervariable II**

Posición	G7		G9	
	N	%	N	%
p 146 <sup>a</sup>				
T	43	70,5	49	36
C	18	29,5	87	64
p 153 <sup>b</sup>				
A	43	70,5	74	54,4
G	18	29,5	62	45,6
p235 <sup>c</sup>				
A	44	72,1	71	52,2
G	17	27,9	65	47,8
Total	61		136	

a, b, c; p < 0.05, chi cuadrada

Apoyados en los resultados obtenidos de los sitios polimórficos analizados individualmente y la asociación de los haplotipos con 5 SNP's con el grupo G9, se comparó la distribución de los haplotipos H5A y H2B entre los grupos de virus (Ver figura 25)

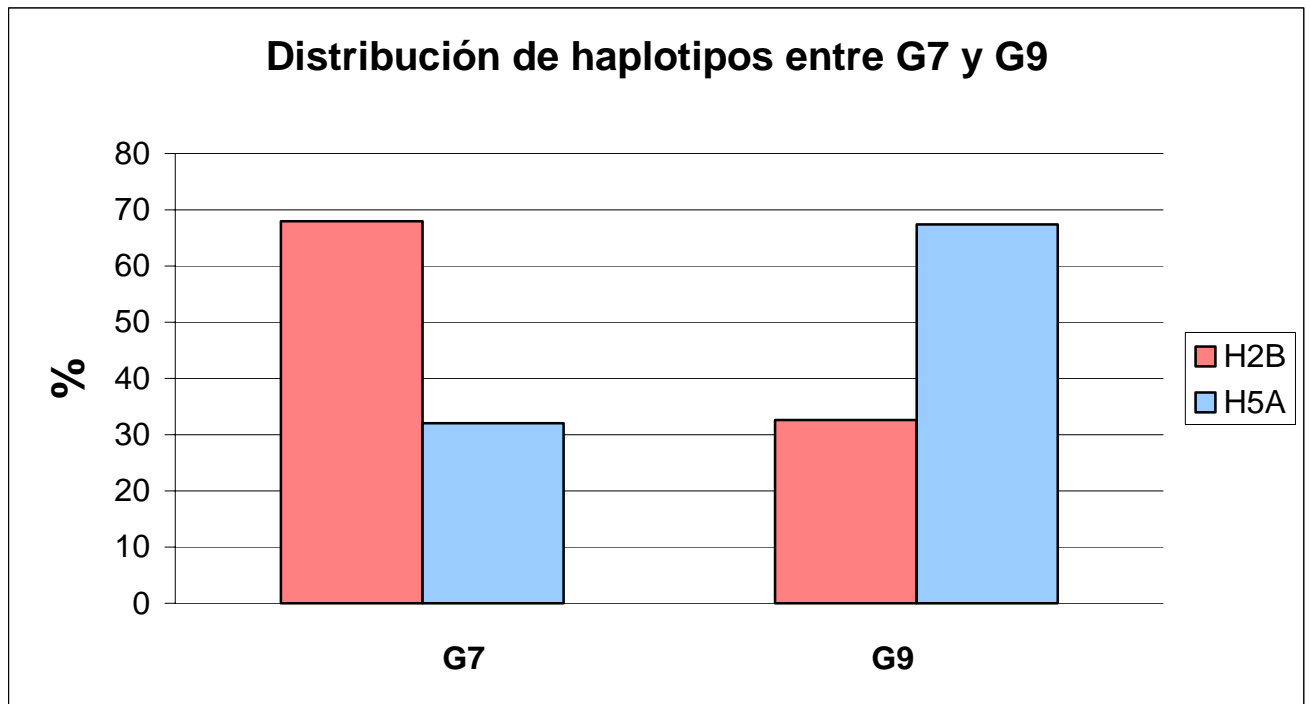


Fig. 26 Distribución de los haplotipos H2B y H5A entre los grupos de virus.

En este análisis se observó que las mujeres con haplotipo H2B están infectadas con mayor frecuencia por los tipos virales del grupo G7 (68%), mientras que las mujeres con haplotipo H5A están infectadas con mayor frecuencia por los tipos pertenecientes al grupo G9 (67.4%) ( $p=0.009$ , chi-cuadrada).

## VI. DISCUSIÓN

### Haplotipos mitocondriales

En este trabajo el objetivo fue determinar los polimorfismos del ADNm y encontrar una asociación con los tipos virales más frecuentes en el cáncer cervical en México. Para ello se secuenció el ADNm de 223 mujeres con cáncer cervical y se determinaron los haplotipos mitocondriales.

Las estrategias experimentales para el análisis de polimorfismos en la secuencia del ADNm se han dividido en dos: 1) mediante el uso de enzimas de restricción, lo que permite caracterizar sitios de restricción polimórficos propios de determinadas razas o grupos étnicos denominados haplogrupos (Cann et al, 1989), 2) mediante la secuenciación de las regiones hipervariables I y II del D-loop del ADNm (Merriwether et al, 1991).

En nuestro estudio secuenciamos la región hipervariable II, que se localiza de la posición 73 a la posición 340 del ADNm humano. En esta región se encontraron 100 haplotipos distintos, ningún haplotipo encontrado fue igual a la secuencia de referencia (Secuence Reference Cambridge, SRC). Un haplotipo es el conjunto SNP's de una muestra. En estudios realizados en Asia y Europa se han encontrado de 116 a 130 haplotipos distintos en poblaciones de 200-250 individuos estudiados (Mabuchi et al, 2007), esto habla del polimorfismo del ADN mitocondrial por si mismo. Secuenciando únicamente la región hipervariable II no fue posible determinar haplogrupos, para ello es necesario realizar ensayos con enzimas de restricción o la secuenciación de la región hipervariable I. Para las poblaciones americanas se han descrito cuatro haplogrupos principales A, B, C y D, los cuáles se definen en función de tres sitios de restricción polimórficos y de una deleción en la región intergénica V. El haplotipo A se define por la ganancia de un sitio para la enzima Hae III en la posición 663; el haplotipo B por la deleción de un fragmento de 9 pb en la región intergénica COII/tRNA<sup>LYs</sup>; el haplotipo C por la pérdida de un sitio para la enzima Hinc II en la posición 13259 y el haplotipo D por la pérdida de un sitio para la enzima Alu I en la posición 5176 (Torrioni et al, 1993). Determinar los haplogrupos a los que pertenecen nuestras muestras sería de gran utilidad para conocer los antecedentes genéticos de la población estudiada.

De los 50 sitios polimórficos encontrados en este estudio, 7 son inserciones, de los 43 sitios polimórficos restantes, el 81.4% presentan transiciones, el 11.6% transversiones y el 7% son trialélicos. En estudios realizados en poblaciones europeas las frecuencias de cambios en sitios polimórficos en esta región del ADN humano, son similares encontrando predominantemente transiciones (75%) y con menos frecuencia transversiones (15%) (Lutz et al, 1998).

La posición 195 es trialélica, el SNP 195A se asocia al macrohaplogrupo M, el cuál se originó en Asia, el SNP 195C está asociado a poblaciones europeas (Rajkumar et al, 2006), de las 7 muestras que presentaron este SNP 6 presentan el alelo C.

Las posiciones 73 y 263 son altamente polimórficas y muy frecuentes en las muestras, lo que puede indicar polimorfismos asociados a la población. Existen datos que sustentan que el cambio en la posición 263 es un polimorfismo adquirido hace muchas generaciones y que está presente en las poblaciones que migraron por el estrecho de Bering, lo que puede explicar la alta frecuencia en nuestras muestras (Torrioni et al, 2001).

Las regiones microsatélite localizadas en las posiciones 248-249 y 286-291 tienen una relación directa, siempre que hay una delección en la p249, se deletan 2 adeninas en las posiciones 286-287, de manera que se tienen haplotipos con 1A – 4A y haplotipos con 2A-6A, este polimorfismo se observó en un estudio previo en una población de Argentina, donde concluyen que los haplotipos amerindios en este país son del tipo 1A-4A (Ginther et al, 1993), cabe mencionar que es la única referencia donde se describe este polimorfismo.

La región 303-315 constituida por dos trectos de citosinas de 7 y 5 residuos interrumpidas por una timina (CCCCCTCCCC) se le ha denominado región D310. Las inserciones en estos trectos de policitocinas se han reportado en estudios de cáncer de cabeza y cuello (Lievre et al, 2006), cáncer oral y esofágico (Kose et al, 2005), cardiomiopatías y en cáncer cervical; en algunos estudios el polimorfismo de esta región se asocia al desarrollo de tumores primarios e inclusive se propuso como una herramienta molecular de diagnóstico (Parrela et al, 2003). Sin embargo, en otros estudios se propone que no puede establecerse alguna asociación entre el polimorfismo de la región D310 y los procesos malignos (Maximo et al, 2005).

De hecho el polimorfismo en la región D310 se ha encontrado frecuentemente en poblaciones amerindias y caucásicas, y basados en esas evidencias nuestros resultados podrían sugerir que el polimorfismo encontrado esté asociado al origen mestizo de nuestra población.

En este estudio es más frecuente la presencia de 8 citosinas (46.3%) en la región 303-309, aunque se encontraron 5, 7 y 9 residuos de citosina en los haplotipos descritos con frecuencias de 0.5%, 24.5% y 25.0% respectivamente, no encontramos una diferencia en la distribución entre los grupos G7 y G9 en estas regiones microsátélites. El tracto 311-315 tiene 5C en la SRC, en nuestro estudio más del 99.5% de las muestras presentan 6 citosinas, las inserciones en esta región se han reportado como un sitio clave de heteroplasmia. El motivo C8-T-C6, que es el motivo más frecuente en nuestras muestras, está asociado al haplogrupo J, el cuál es muy frecuente en poblaciones europeas. (<http://www.mitomap.org>, 2006).

En tres muestras se encontró una deleción de 6 nucleótidos de las posiciones 106-111, esta deleción ha sido reportada como una mutación única en poblaciones nativas de Sudamérica (Merriwether et al, 1993) y en haplotipos pertenecientes al haplogrupo A, el cuál como ya hemos mencionado es muy común en poblaciones de América. (Torroni et al, 1993).

### **Asociación del polimorfismo mitocondrial y la infección por VPH**

Integrando los resultados obtenidos del polimorfismo mitocondrial y comparándolos entre los grupos de virus, encontramos que las mujeres que presentan haplotipos H5A están infectadas más frecuentemente por los tipos virales 16, 31, 58 y 52 y el haplotipo H2B esta más asociado a la infección con los tipos virales 18, 45 y 59.

La asociación del haplotipo H2B presente en la población mexicana podría ser un marcador de susceptibilidad para la infección con los virus del grupo G7, pues la infección con los tipos virales de este grupo es más frecuente en nuestro país que en mujeres de España y otras regiones de Europa que no poseen dicho haplotipo, en estos países la prevalencia de estos tipos virales (VPH 18 del 3.2% y VPH 45 del 5.9%) es mucho menor que la que se reporta en las poblaciones mexicanas (VPH 18 14.8% y VPH 9.4%).

El haplotipo H5A se asocia al haplogrupo A, el cuál esta muy relacionado con la población amerindia, esto es muy importante pues los virus a los que se asocia este haplotipo en nuestro estudio son los de la especie 9, que incluye principalmente al tipo 16. Este tipo viral es el más frecuente en mujeres con CaCU (46.2% en nuestro estudio), esta compuesto por un conjunto de clases virales, entre ellas, Europeas (E ), africanas (Af) y Asiático-americanas (AA-a y AA-c), la subclase AA-c es muy frecuente en México y se ha demostrado en estudios previos del grupo del Dr. Jaime Berumen es 9 veces más oncogénica que la clase Europea, es posible que la asociación encontrada entre el haplotipo H5A y la infección por el VPH 16 sea de susceptibilidad.

Por ultimo es importante mencionar que el rol del ADN mitocondrial en los procesos de oncogénesis no ha sido bien definido, y mediante estudios de asociación pueden establecerse mecanismos geonómicos mitocondriales en los procesos de la tumorigénesis.

### **Detección y tipificación del VPH**

En este estudio la detección y tipificación del VPH se realizó mediante la técnica de PCR y secuenciación. Se detectaron 96% de muestras con infección de algún tipo de virus del papiloma humano, se ha reportado el hallazgo de VPH's hasta en un 99.7% en tumores cervicales, por lo que es considerado un factor obligado en el cáncer cervical. (Walboomers et al, 1999). La distribución de los virus del papiloma humano en mujeres con cáncer cervical en nuestro estudio, mostró una alta frecuencia de los virus de alto riesgo (91.4%), estos resultados corresponden a lo esperado, pues se sabe que la infección con tipos virales de alto riesgo es una causa necesaria para el desarrollo del CaCU.

El VPH16 es el más frecuente (46.2%), lo cual se ha demostrado en numerosos estudios previos en donde se ha encontrado hasta en un 50% (Muñoz et al, 2003), seguido de los tipos 18, 45 y 31 (14.8%, 9.4%, y 5.4%) respectivamente. En estudios recientes en donde participan poblaciones de Europa, Asia, África y América, la prevalencia es muy similar, encontrándose al VPH 16 más frecuentemente (48%) seguido de los tipos 18, 31, 33, 35, 45, 52 y 58. En estos estudios también se ha descrito que la frecuencia de los VPH 16/18 en países en vías de desarrollo es del 63-72% (Smith et al, 2007). En nuestro estudio la frecuencia de los VPH 16/18 fue del 61%, este dato es muy importante para el impacto que pueden tener las vacunas contra el VPH de Glaxo Smith-Clain (bivalente 16 y 18) y Merck (tetraivalente 6, 11, 16 y 18).



En nuestro estudio un 4.5% de las mujeres con cáncer cervical están infectadas con virus de bajo riesgo, en estudios previos se reportó un 2% de infecciones con virus de bajo riesgo (Muñoz et al, 2003), el 4.0% de las mujeres fueron negativas para el virus del papiloma humano.

**Perspectivas.**

Dado que la asociación de los tipos virales y los polimorfismos en el ADNm se concluyó en este estudio, para conocer los antecedentes genéticos de nuestra población sería muy recomendable secuenciar la RH I, esto permitiría determinar los haplogrupos a los que pertenece la población mexicana estudiada y el estudio de polimorfismos poblacionales. Otra estrategia sería realizar un estudio con mujeres sanas (estudio de casos-controles), para determinar si algún haplotipo pudiera estar asociado a la protección o riesgo en el desarrollo del cáncer cervical.

## VII. CONCLUSIONES

- Al analizar la región hipervariable II del ADN mitocondrial humano de las mujeres con cáncer cervical infectadas por VPH, se encontraron 100 haplotipos distintos, los haplotipos más comunes son los que presentan 5 y 2 SNP's, los cuáles están asociados a la infección con las familias 9 y 7 de la especie alfa papilomavirus respectivamente.
- La asociación entre haplotipos mitocondriales y la infección con ciertos tipos virales de papiloma puede ser un marcador genético de susceptibilidad para la infección con virus del papiloma humano pertenecientes a las especies 7 y 9.
- Se comprobó la alta asociación entre el cáncer cervical y la infección por virus del papiloma humano de alto riesgo, en este estudio el 96% de las mujeres con CaCu presentaron infección por algún tipo de VPH, el tipo viral más frecuente fue el VPH 16 seguido de los tipos 18, 45 y 31.

## **Perspectivas.**

Dado que la asociación de los tipos virales y los polimorfismos en el ADN<sub>m</sub> se concluyó en este estudio, para conocer los antecedentes genéticos de nuestra población sería muy recomendable secuenciar la RH I, esto permitiría determinar los haplogrupos a los que pertenece la población mexicana estudiada y el estudio de polimorfismos poblacionales. Otra estrategia sería realizar un estudio con mujeres sanas (estudio de casos-controles), para determinar si algún haplotipo pudiera estar asociado a la protección o riesgo en el desarrollo del cáncer cervical.

## VII. CONCLUSIONES

- Al analizar la región hipervariable II del ADN mitocondrial humano de las mujeres con cáncer cervical infectadas por VPH, se encontraron 100 haplotipos distintos, los haplotipos más comunes son los que presentan 5 y 2 SNP's, los cuáles están asociados a la infección con las familias 9 y 7 de la especie alfa papilomavirus respectivamente.
- La asociación entre haplotipos mitocondriales y la infección con ciertos tipos virales de papiloma puede ser un marcador genético de susceptibilidad para la infección con virus del papiloma humano pertenecientes a las especies 7 y 9.
- Se comprobó la alta asociación entre el cáncer cervical y la infección por virus del papiloma humano de alto riesgo, en este estudio el 96% de las mujeres con CaCu presentaron infección por algún tipo de VPH, el tipo viral más frecuente fue el VPH 16 seguido de los tipos 18, 45 y 31.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Alberts B. MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL. Garland Science. Fourth Ed. USA. 2002. Chap. 8. pp: 508-509.
2. Alonso A, et al. Detection of somatic mutations in the mitochondrial DNA control region of collateral and gastric tumors by heteroduplex and single-strand conformation analysis. Electrophoresis. 1997;18:682-685.
3. Arroyo M, Bagchi S, Raychaudhuri P. Association of human papillomavirus type 16 E6 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. Mol Cell Biol. 1993;13:6537-46.
4. Bandara LR, et al. Cyclin A and the retinoblastoma gene product complex with a common transcriptor factor. Nature. 1991;352 :249-51.
5. Berumen J, et al. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk of cervical cancer: A case-control study. J Natl Cancer Ins. 2001;93:1325-1330
6. Big Dye Terminador Versión 3.0, de:  
[http://awcmee.massey.ac.nz/Data/BDTv3.1\\_Protocol\\_04337035.pdf](http://awcmee.massey.ac.nz/Data/BDTv3.1_Protocol_04337035.pdf)
7. Calhoun ES, et al. Host genetic polymorphism analysis in cervical cancer. Clin. Chem. 2002 Aug ;48(8) :1218-24.
8. Cann RL, Stoneking M, Wilson AC. Mitochondrial DNA and human evolution. Nature 1987; 325: 31-6.
9. Casas L, et al. Asian-american variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. Int. J. Cancer. 1999;83:449-55.
10. Castle PE, et al. PCR testing of pooled longitudinally collected cervical specimens of women to increase the efficiency of studying human papillomavirus infection. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2005 Jan;14(1):256-60.

11. Chen JJ, Reid CE, Band V. Interaction of papillomavirus E6 oncoproteins with a putative calcium-binding protein. *Science*. 1995;269:529-31.
12. Conger KL, et al. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primasa. *J. Biol. Chem*. 1999 Jan 29;274(5):2696-705.
13. De Villiers EM, et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 Jun 20 ;324(1) :17-27.
14. De Roda Husman AM. et al. Teh use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*. 1995;76:1057-62.
15. Dell G, et al. Comparison of the structure and DNA.binding properties of the E2 proteins from an oncogenic and a non-oncogenic human papillomavirus. *J. Mol. Biol*. 2003 Dic 12;334(5):979-91.
16. Dyson N, et al. The human papillomavirus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989;243:934–7.
17. FASTA, de:  
<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/>
18. Fliss MS, et al. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science*. 2000;287:2017-2019.
19. Foster SA, Galloway DA. Human papillomavirus type 16 E7 alleviates a proliferation block in early passage human mammary ephytelial cells. *Oncogene*. 1996 ;12 :1773-1779.
20. Franco EL, et al. The epidemiology of cervical cancer. *Cancer J*. 2003 Sep-Oct; 9(5):348-359.

21. Gao Q, et al. The E6 oncoproteins of high-risk papillomaviruses bind to a novel putative GAP protein, E6TP1, and target it for degradation. *Mol Cell Biol.* 1999;19:733–44.
22. Engelmark MT et al. Identification of susceptibility loci for cervical carcinoma by genome scan of affected sib-pairs. *Hum Mol Genet.* 2006 Nov 15;15(22):3351-60.
23. Giri I, Yaniv M. Structural and mutational analysis of E2 transactivating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO T.* 1988 Sep;7(9):2823-9.
24. Gene bank, de:  
<http://www.ncbi.org>
25. Globocan 2002, IARC
26. Graham DA, Herrington CS. HPV 16 E2 gene disruption and sequence variation in CIN3 lesions of the cervix: relation to numerical chromosome abnormalities. *Mol. Pathol.* 2000 Aug;53(4):201-6.
27. Harro D, et al. Safety and Immunogenicity Trial in Adult Volunteers of a Human Papillomavirus 16 L1 Virus-Like Particle Vaccine. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93:284-292.
28. INEGI, de:  
<http://cuentame.inegi.gob.mx>
29. Ingman M, et al. Mitochondrial genome variation and the origin of modern humans. *Nature.* 2000 Dec 7;408(6813):708-13.
30. Ishida WS, et al. Co-risk factors for HPV infection in Northeastern Thai women with cervical carcinoma. *Asian Pac J cancer Prev.* 2004 Oct-Dec;5(4):383-6.
31. Jacobs MV. et al. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 1995;33:901-5.



32. Kalantari M, et al. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPN16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int. J. Gynecol. Pathol.* 1998 Apr;17(2):146-5
33. Kim SW, Yang JS. Human papillomavirus type 16 E5 protein as a therapeutic target. *Yonsei. Med. J.* 2006 Feb 28;47(1):1-14.
34. Kiyono T, et al. Binding of high risk human papillomavirus E6 oncoprotein to the human homologue of the Drosophila large tumor suppressor protein. *Natl. acad. Sci. USA.* 1997;94:11612-6.
35. Lazcano-Ponce E, et al. Epidemiology of HPV infection among mexican women with normal cervical cytology. *Int. J. Cancer.* 2001 Feb 1;91(3):412-20.
36. Levin BC, et al. A human mitochondrial DNA standard reference material for quality control in forensic identification, medical diagnosis, and mutation detection. *Genomics.* 1999;55:135-146.
37. Lewin B. *GENES VIII.* Pearson Prentice Hall. Eight Ed. USA. 2004. Chap. 3. pp: 75-78.
38. Lutz S, et al. Location and frequency of polymorphic position in the mtDNA control region of individuals of Germany. *Int J Legal Med.* 1998;111(2):67-77.
39. Lymphoprep®, de:  
<http://www.axis-shield.com/densityhome/density/Data%20Sheet%20Lymphoprep.pdf>
40. Mabuchi T, et al. Typing the 1.1 kb control region of human mitochondrial DNA in Japanese individuals. *J Forensic Sci.* 2007 Mar;52(2):355-63.
41. Madelein MM, et al. Human leukocyte antigen class II and cervical cancer risk : a population-based study. *J Infect Dis.* 2002. Dec 1 ;186(11) :1565-74.

42. Magal SS, et al. Induction of the apoptosis in human keratinocytes containing mutated p53 alleles and the inhibition by both the E6 and E7 oncoproteins. *Int J Cancer*. 1998;75:96-104.
43. Merriwether A, et al. The structure of human mtDNA variation. *J Mol Evol* 1991; 33: 543-55.
44. MITOMAP: A human Mitochondrial Genome Data base, de:  
<http://www.mitomap.org>
45. Miyazono F, et al. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region occur frequently in the adenocarcinoma in Barret's esophagus. *Oncogene*. 2002;21:3780-3783.
46. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. Atomic model of the papillomavirus capsid *EMBO J*. 2002 Sep 16;21(18):4754-62.
47. Muñoz N, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med*. 2003;348:518-27.
48. Nogueira NC, et al. Interleukin-6 polymorphisms and the risk of cervical cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 May-Jun;16(3):1278-82.
49. Parrella P, et al. Mutations of the D310 mitochondrial mononucleotide repeat in primary tumors and cytological specimens. *Cancer Lett*. 2003;190:73-77.
50. Passarge E. *Genetica Texto y atlas*. Ed. Medica Panamericana. 2da Ed. Argentina. 2004 pp. 52-55
51. Puthenveetil JA, Frederickson SM, Reznikoff CA. Apoptosis in human papillomavirus 16 E7-, but not in E6- immortalized human uroepithelial cells. *Oncogene*. 1996;13:1123-31.

52. Rajkumar R, et al. Phylogeny and antiquity of M macrohaplogroup inferred from complete mtDNA sequence of Indian specific lineages. *BMC Evol Biol.* 2005 Apr 2;5(1):26.
53. Reznikoff CA, et al. Elevated p16 at senescence and loss of p16 at immortalization in human papillomavirus 16 E6, but not in E7, transformed human uroepithelial cells. *Cancer Res.* 1996;56:2886-90.
54. Ronco LV, Karpova AY, Vidal M, Howley PM. Human papillomavirus 6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev.* 1998;12:2061–72.
55. Sanders CM, Maitland NJ. Kinetic and equilibrium binding studies of the human papillomavirus type 16 transcription regulatory protein E2 interacting with core enhancer elements. *Nucleic. Acids Res.* 1994 Nov 25;22(23):4890-7.
56. Scheffner M, et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell.* 1990;63:1129-1136.
57. Scheurer ME, et al. Correlation of human papillomavirus type 16 and human papillomavirus type 18 W7 messenger RNA levels with high degree cervical dysplasia. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2005 Aug;14(8):1948-52.
58. Sharma H, et al. Mutations in the mitochondrial DNA D-loop region are frequent in cervical cancer. *Cancer Cell Int.* 2005 Dec 16;5:34.
59. Shields T, et al. A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among US women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2004;13(10):1574-82.
60. Smith JS, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: A meta-analysis update. *Int J Cancer.* 2007 Apr 2; (Epub ahead of print)

61. Su TH, et al. CTLA-4 gene and susceptibility to human papillomavirus 16-associated cervical squamous cell carcinoma in Taiwanese women. *Carcinogenesis*. 2007 Mar 10; [Epub ahead of print].
62. Suzuki M, et al. Alterations in the mitochondrial displacement loop in lung cancers. *Clin Cancer Res*. 2003;9:5638-5641.
63. Thomas M, Banks L. Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol*. 1999;80:1513-7.
64. Tong X, Hawley PM. The bovine papillomavirus E6 oncoprotein interaction with paxillin and disrupts the actin cytoskeleton. 1997. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:4412-7.
65. Torroni A, et al. Asian affinities and continental radiation of the four founding native American mtDNAs. *Am J Hum Genet* 1993; 53: 563-90.
66. Walboomers JM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cancer cervical worldwide. *J Pathol*. 1999 Sep;189(1):1-3.
67. Wang Y, et al. Microsatellite instability in mitochondrial genome of common female cancers. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Jan-Feb;16 Suppl 1:259-66
68. Werness BA. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990;248:76-9.
69. Woon-Won et al. Strategies against human papillomavirus infection and cervical cancer. *The Journal of Neurobiology*. 2004;42(4):255-66.
70. Yamada T, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancer a worldwide perspective. *J. Virol*. 1997;71:2463-72.
71. Zehbel I, et al. Risk of cervical cancer and geographical variants of human papillomavirus 16 E6 polymorphism. *Lancet*. 1998;352:1441-52.

72. Zerfass K, et al. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 1995;69:3689-99.
73. Zerfass-Thome K, et al. Inactivation of the cdk inhibitor p27K1Pi by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. 1996;13:2323-30.
74. zur Hausen H. papillomaviruses causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *Journal Nat. Cancer Inst.* 2000 may;92(9):690-8.

## X. ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico.

**AA:** asiático-americano.

**Af:** africanas (variantes).

**As:** asiáticas (variantes).

**ASCUS:** Células atípicas de significancia indeterminada.

**CaCU:** Cáncer cervicouterino.

**HC:** Captura de híbridos.

**HLA:** Antígeno leucocitario humano.

**HSIL:** Lesión intraepitelial de alto grado.

**HV1:** Región Hipervariable 1.

**HV1:** Región Hipervariable 2.

**ICTV:** Comité internacional de Taxonomía viral.

**LSIL:** Lesión intraepitelial de bajo grado.

**LCR:** Región larga de control.

**NIC:** Neoplasia intraepitelial cervical.

**OMS:** Organización mundial de la salud.

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.

**pb:** Pares de bases.

**pRb:** Proteína de retinoblastoma.

**ROS:** Moléculas reactivas de oxígeno.

**SNP's:** Polimorfismo de un solo nucleótido.

**SIDA:** Síndrome de inmunodeficiencia adquirida.

**SRC:** Secuencia de referencia de Cambridge.

**VPH:** Virus del papiloma humano.

**VP:** Virus del papiloma.

## XI. GLOSARIO

**Apoptosis:** Muerte celular programada, donde la célula participa activamente en su autodestrucción.

**Carcinoma:** Forma de cáncer con origen en células de estirpe epitelial o glandular.

**Clamidiasis:** Es una enfermedad de transmisión sexual (ETS), la cual su agente etiológico es una bacteria llamada *Chlamydia trachomatis* que puede afectar tanto a hombres como a mujeres.

**Condiloma:** Crecimiento de verrugas blandas en los genitales o en la región perianal que es causada por algunos tipos de virus del papiloma.

**Cápside:** Estructura proteica formada por una serie de monómeros llamados capsómeros en la cual se encuentra el material genético del virus.

**Displasia:** (del latín "mala forma" = "mal formación") es una anomalía en el aspecto de las células debido a las alteraciones en el proceso de maduración celular. En ocasiones es indicativo de un paso temprano hacia la transformación en una neoplasia.

**Epiteliotrópico:** Afinidad altamente específica hacia el tejido epitelial.

**Episomal:** Cuando un ADN externo no está integrado al ADN de la célula huésped y tiene la capacidad de auto replicarse.

**Gen:** Secuencia lineal de nucleótidos en la molécula de ADN (o ARN en el caso de algunos virus), que contienen la información necesaria para la síntesis de macromoléculas con función celular específica.

**Genoma:** Todo el material genético contenido en las células de un organismo en particular.

**Haplotipos:** Combinación de alelos que definen una región de un cromosoma.

**Haplogrupo:** Grupo de haplotipos, que son series de alelos asociados a una población.

**Homoplasmia:** Presencia total de ADN mitocondrial normal o mutado.

**Heteroplasmia:** Presencia de ADN mitocondrial normal y mutado dentro de una misma célula.

**Incidencia:** Numero de casos nuevos de una enfermedad por año.

**Locus:** Lugar del cromosoma donde se encuentra un gen.

**Mutación:** Cambio en la secuencia nucleotídica del ADN de una base por otra.

**Metaplasia:** Cambio en las características propias de un determinado tipo celular que adopta las propias de células distintas como con las que puede tener un parentesco próximo o remoto.

**Neoplasia:** Alteración de la proliferación y la diferenciación celular, que se manifiesta por la formación de una masa o tumor.

**Oncogenes:** Gen anormalmente activado, cuyo producto (**Oncoproteína**) participa en la transformación de células eucarióticas y está directamente involucrado en el desarrollo de cáncer.

**Polimorfismo:** Múltiples alelos de un gen entre una población, normalmente expresados como diferentes fenotipos.

**Transcripción:** Síntesis de ARN sobre una cadena de ADN.