

122
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**INMUNODETECCION DE PROTEINAS CELULARES
Y VIRALES INVOLUCRADAS EN CANCER HUMANO**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

P R E S E N T A :

NESTOR GABRIEL MORALES PEZA



MEXICO, D. F.

1994

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en su totalidad en el laboratorio 24 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección del Dr. Patricio Gariglio Vidal, Profesor Titular del mencionado departamento, a quien le quedo profundamente agradecido el haberme brindado la oportunidad y el apoyo para realizar este proyecto en el laboratorio a su cargo.

A mis padres, a quienes debo mis virtudes, pero no así mis defectos. Gracias por haberme dado el mejor regalo que jamás pude haber recibido: la vida misma.

Gracias otra vez, por haberse preocupado siempre en darme una educación, la cual, es mi más valioso legado.

Padre, lamento que no pudieras ver terminada esta tesis, por que se que hubiera sido una satisfacción para tí.

Madre, te agradezco todo lo que has hecho por mí, aunque no te lo demuestre.

A Irma, por su constante apoyo y ayuda, sin las cuales, no hubiera sido posible la terminación de esta tesis. Mereces mucho más que una dedicatoria, pero las palabras no son suficientes para expresarte mi amor, admiración y agradecimiento.

A mi hijo, con todo mi corazón. Espero poder educarte con el mismo amor y paciencia con que mi padre me educó a mí.

"Never looking back again..."

N. D.

"El tiempo más oportuno es el único inmediato, y es el más importante porque es solamente en tal momento cuando somos los amos de nosotros mismos; y el hombre más necesario es aquel a quien se encuentra en este momento. Y la obra más importante es la de hacer el bien"

"El verdadero valor de un hombre lo determina, en primer término, hasta qué grado y en qué sentido ha llegado a liberarse del yo"

A. E.

"To be or not to be"

W. S.

"Por mi raza hablará el espíritu"

J. V.-U.N.A.M.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de gran manera al IBQ Adolfo Pedroza Saavedra por su participación en el proyecto y por su amistad a lo largo de esta tesis, unida a su gran ingenio en todo momento.

A la P. de Ing. Amb. Luz María Rangel Ramírez por toda su invaluable ayuda en este trabajo.

Al M. en C. Efraín Garrido Guerrero por la cooperación que siempre mostró y por su amistad durante y después de mi estancia en el laboratorio.

A todos mis compañeros de laboratorio: Ulises Adame, Luis Alvarez, César Bravo, Pedro Chavéz, Miriam Guido, Raúl Meléndez, Enrique Miranda, Consuelo Rodríguez, Mauricio Salcedo, Juan Carlos Santiago, Genaro Vargas, Verónica Valverde y Rocío Zamorano. Por toda la ayuda que me prestaron para la realización de esta tesis y por todo lo que me enseñaron a lo largo de este tiempo.

A todos mis amigos del laboratorio de la Dra. Guadalupe Ortega Pierres (antes laboratorio 12) y muy especialmente a: Raul Argüello, Ramón Coral, Antonio Enciso, Javier Hernández, Arturo Pérez-Taylor, Rosario Salinas y Lilián Yépez. Por todas las innumerables veces que me prestaron su ayuda, por su amistad desinteresada y por todos los excelentes momentos que compartimos y que son algunos de los mejores recuerdos que tengo durante la realización de esta tesis.

Agradezco muy especialmente y de gran manera a la Dra. Rosario Velasco Santiago por todo el entusiasmo, ayuda y amistad que mostró durante la recolección de los sueros.

Mi reconocimiento al Dr. César Santiago Pineda, por su labor educativa y en la medicina y por haber permitido y facilitado la realización de esta colaboración.

Al Dr. Lutz Gissmann, por haberme enseñado tanto en tan poco tiempo, por haber confiado en mí durante esta colaboración y así darme también confianza a mí mismo y por la amistad que me ha mostrado, la cual aprecio, y que espero no desilucionar.

A la Dra. Ingrid Jochmus por las bacterias con los plásmidos, por las indicaciones para la obtención de las proteínas de fusión y del manejo de los sueros de los pacientes y por todas las facilidades que siempre mostró.

Al jurado de esta tesis por sus acertadas sugerencias y comentarios: Dr. Patricio Gariglio, Dr. René Cárdenas, Dr. Emilio Rojas, M. en C. Mario Altamirano y M. en C. Víctor Valdés.

A los profesores que han contribuido a toda mi formación: por que fueron verdaderamente importantes mediante su ejemplo y sus enseñanzas.

Al Dr. Alejandro García Carrancá por su constante incentivo a terminar esta tesis y por la paciencia que mostró.

A todas aquellas personas (y son incontables) que, de una manera o de otra, han contribuido a que llegue a esta primera gran meta de mi vida.

Al todo el personal de la biblioteca del area biológica del CINVESTAV.

A Elías y a María Elena por todos los medios que prepararon en la cocina del Departamento de Genética y Biología Molecular.

A Mario por la limpieza del material de cristalería.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), donde tuve la fortuna de llegar para realizar esta tesis; por ser la institución de investigación más importante del país y por haberme brindado innumerables momentos de felicidad y satisfacción que perdurarán en mi memoria por toda la vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), la institución de educación superior más importante del país, por haberme dado tanto a cambio de tan poco y por haberme hecho libre al mostrarme la verdad de las cosas.

ABREVIATURAS

ACS	American Cancer Society (Sociedad Americana de Cáncer)
BPV	bovine papillomavirus (papilomavirus bovino)
CaCu	cáncer cérvico-uterino
cDNA	complementary DNA (DNA complementario)
CIS	carcinoma <i>in situ</i>
cpm	cuentas por minuto
CRPV	cottontail rabbit papillomavirus (papilomavirus del conejo de cola de algodón)
DNA	deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
D.O.	densidad óptica
EBV	Epstein-Barr virus (virus de Epstein-Barr)
HBV	hepatitis B virus (virus de la hepatitis B)
HPV	human papillomavirus (papilomavirus humano)
HPV-16	human papillomavirus type 16 (papilomavirus humano tipo 16)
HSV	herpes simplex virus (virus herpes simple)
HTLV-I y II	human T-cell lymphotropic virus type I y II (virus linfotrópico de las células T tipo I y II)
kb	kilobases
kā	kilodaltones
kpb	kilopares de bases
LB	medio Luria
LB-amp	medio líquido Luria con ampicilina
LCR	long control region (región larga de control)
LLA	leucemia linfoblástica aguda, también llamada leucemia linfocítica aguda o leucemia linfática aguda
M	molar
μg	microgramo(s)
μl	microlitros
μm	micrometros o micras
mCi	millicurie
ml	mililitros
mM	minimolar
mRNA	messenger RNA (ácido ribonucleico mensajero o RNA mensajero)
N	cualquier nucleótido; también para normal; y para amino(-terminal)
NCI	National Cancer Institute (Instituto Nacional de Cáncer)
NIC	neoplasia intraepitelial cervical
ORF	open reading frame (marco de lectura abierta)

OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	pares de bases
PVs	papilomavirus
rpm	revoluciones por minuto
SNF	suero no fetal
SS	Secretaría de Salud
TEA-HCl	trietanolamina hidrocloorida
t. a.	temperatura ambiente
U	unidades
u.f.p.	unidad(es) formadora(s) de placa
URR	upstream regulatory region (región regulatoria corriente arriba)
UV	luz ultravioleta
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION.	
EL CANCER EN EL MUNDO	3
EL CANCER EN MEXICO	5
EL CANCER CERVICO-UTERINO (CaCU)	6
HISTORIA NATURAL DE LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL ...	8
LEUCEMIAS	10
MARCO TEORICO.	
BIOLOGIA MOLECULAR DEL CANCER	11
ONCOGENES	12
VIRUS Y CANCER	14
LOS PAPILOMAVIRUS (PVs)	15
CLASIFICACION	17
ORGANIZACION DE LOS GENOMAS DE PVs	18
PAPILOMAVIRUS HUMANOS Y CANCER ANOGENITAL	21
BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS PAPILOMAVIRUS HUMANOS	27
LOS PAPILOMAVIRUS HUMANOS DE ALTO RIESGO (HPV-16 y HPV-18) .	29
LOS ONCOGENES E6 Y E7	31
DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA PROTEINAS TEMPRANAS DE HPV-16	37
LAS PROTEINAS DE 110 Y 115 KD	40
LA BIBLIOTECA DE cDNA EN LAMBDA gt11	42
JUSTIFICACION	49
OBJETIVOS	50
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	51
MATERIALES Y METODOS.	
RECOLECCION DE SUEROS	53
PLASMIDOS CON LOS MARCOS DE LECTURA ABIERTA E4, E6 Y E7 DEL HPV-16	53
MANTENIMIENTO DE BACTERIAS	56
OBTENCION DE LAS PROTEINAS DE FUSION CON E4, E6 Y E7 DEL HPV-16 EXPRESADAS EN BACTERIAS.	
PROTEINAS DE FUSION DE LA SERIE MS2	56
PROTEINAS DE FUSION DE LA SERIE CII	58
ANALISIS DE PROTEINAS.	
ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS	59
TINCION DE GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS CON AZUL DE COOMASSIE	60
ELECTROELUCION	62
ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS DE GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS A PAPEL DE NITROCELULOSA	63
TINCION DE LAS PROTEINAS EN EL PAPEL DE NITROCELULOSA	64
PREABSORCION DE LOS SUEROS	64
WESTERN BLOT	65
MARCAJE DE LA PROTEINA A CON 125 I	68
LINEA CELULAR HeLa	70
INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS CON CICLOHEXIMIDA ...	71
OBTENCION DE NUCLEOS DE CELULAS HeLa	72
PREABSORCION DEL ANTICUERPO	73
TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA DE EXPRESION DE cDNA EN LAMBDA gt11	74
PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD EN EL RECONOCIMIENTO DE CANDIDATAS DEL TAMIZAJE	76
AMPLIFICACION Y TITULACION DE LAS CANDIDATAS	77

EXPRESION DE PROTEINAS EN FAGOS LAMBDA gt11 PARA ELECTROFORESIS	78
RESULTADOS.	
DISTRIBUCION DE EDADES DE LAS PACIENTES	80
DISTRIBUCION DE LESIONES DE LAS PACIENTES	80
PRUEBA PARA COMPROBAR LA ESPECIFICIDAD DE LA REACCION DE LOS ANTICUERPOS A LAS PROTEINAS E4, E6 Y E7 DEL HPV-16	81
ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEINAS E4, E6 Y E7 DEL HPV-16 EN LOS SUEROS DE LAS PACIENTES	82
DISTRIBUCION DE LOS ANTICUERPOS CON RESPECTO A GRUPOS DE EDAD	82
DISTRIBUCION DE LOS ANTICUERPOS CON RESPECTO A LESIONES GENITALES ASOCIADAS CON HPV	84
LAS PROTEINAS DE 110 Y 115 KD	87
VIDA MEDIA DE LAS PROTEINAS DE 110 Y 115 KD	87
LOCALIZACION INTRACELULAR DE LAS PROTEINAS DE 110 Y 115 KD ..	89
IDENTIFICACION DE CANDIDATAS EN LA BIBLIOTECA DE cDNA	91
AMPLIFICACION Y TITULO DE LAS CANDIDATAS	94
DISCUSION.	
ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEINAS TEMPRANAS DEL HPV-16 EN SUEROS DE LAS PACIENTES	96
LAS PROTEINAS DE 110 Y 115 KD	111
EL TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA DE cDNA	112
CONCLUSIONES	114
BIBLIOGRAFIA	116

FIGURAS

Figura 1. La frecuencia de la infección por el papilomavirus humano (HPV) en cérvix (mediante la detección del DNA de HPV con la técnica de "Southern blot") está correlacionada con el epitelio normal y la aparición de lesiones benignas, premalignas y malignas. Página 9.

Figura 2. Organización genómica del HPV-16. Página 28.

Figura 3. Plásmidos utilizados para la expresión de las proteínas E4, E6 y E7 del HPV16 con los insertos de fusión MS2 y cII. Página 55.

Figura 4. Gel de proteínas teñido con azul de Coomassie. Página 61.

Figura 5. Detección de anticuerpos, en sueros de las pacientes, contra las proteínas tempranas E4, E6 y E7 de HPV-16, por la técnica de "Western blot". Página 66.

Figura 6. Vida media de las proteínas de 110 y 115 kd. Página 88.

Figura 7. Localización extranuclear de las proteínas de 110 y 115 kd. Página 90.

Figura 8. Absorción exitosa del anticuerpo. Página 92.

Figura 9. Las candidatas aparecieron por duplicado en cada experimento. Página 93.

Figura 10. Las candidatas no son inespecíficas al reconocimiento por el anticuerpo ni a la proteína A marcada con ^{125}I . Página 95.

TABLAS

Tabla 1. Funciones de los genes de papilomavirus. Página 20.

GRAFICAS

Gráfica 1. Distribución por edades (en grupos de 10 años) de pacientes seropositivas a proteínas E4, E6 y E7 de HPV16. Página 83.

Gráfica 2. Distribución por edades (en grupos de 5 años) de pacientes seropositivas a proteínas E4, E6 y E7 de HPV16. Página 83.

Gráfica 3. Distribución de reacciones seropositivas a E4, E6 y E7 con respecto a lesiones cervicales asociadas a HPV. Página 85.

RESUMEN

El cáncer cérvico-uterino y la leucemia linfoblástica aguda son dos de los tipos principales de cáncer en México. En este trabajo los objetivos fueron encontrar marcadores moleculares de lesiones precursoras de cáncer cérvico-uterino, caracterizar parcialmente el doblete de 110 y 115 kd (observado originalmente en leucemias, con un anticuerpo anti-Myc), compararlo con la familia de proteínas Myc, y a partir de una librería de cDNA en lambda gt11 encontrar candidatas que potencialmente expresen la proteína de 115 kd (presente en células en proliferación).

Los papilomavirus (HPVs) son un grupo de virus epitelio-tróficos. Se piensa que el HPV tipo 16 (HPV-16) está fuertemente involucrado en la patogénesis del cáncer cérvico-uterino, entre otras razones, debido a que codifica dos oncoproteínas: E6 y E7. En el presente estudio se analizaron, mediante la técnica de "Western blot", sueros de pacientes con diferentes grados de lesiones cervicales asociadas con HPV, en busca de anticuerpos contra proteínas específicas del HPV-16: E4, E6 y E7. E4 se escogió por ser la proteína predominante en infecciones por HPV-1. Los resultados muestran que las pacientes desarrollan anticuerpos contra las proteínas E4 o E7 desde estadios tempranos de neoplasia intraepitelial cervical y contra la proteína E6 sólo en el estadio más avanzado. Esto sugiere que la respuesta inmune contra el virus ocurre tempranamente y apoya el hecho de que muy poca de la gente infectada llega a desarrollar este cáncer. Los anticuerpos contra E6 pueden llegar a ser potencialmente un

marcador de neoplasia en estadio avanzado, provocada por el HPV-16.

En pacientes con leucemia linfoblástica aguda, en líneas celulares transformadas y en linfocitos inducidos a proliferar se ha mostrado la presencia de un doblete proteico de 110 y 115 kd mediante un anticuerpo contra una región altamente conservada en la familia de oncoproteínas Myc. En este trabajo se encontró que este doblete no corresponde ni en vida media ni en localización intracelular a ninguna proteína Myc, apoyando que no se trata de éstas sino de proteínas antigénicamente relacionadas. Finalmente, se utilizó el mismo anticuerpo para encontrar doce candidatas que potencialmente expresan la proteína de 115 kd (la cual se observa diferencialmente en linfocitos en proliferación), a partir de una biblioteca de expresión de cDNA, proveniente de células B de leucemia, en lambda gt11.

INTRODUCCION

EL CANCER EN EL MUNDO

El cáncer es un término general que en el humano sirve para designar a más de 200 enfermedades que pueden presentarse prácticamente en todos los órganos y tejidos del cuerpo (OMS, 1957; WHO, 1978), y que se caracterizan por crecimiento anormal, incontrolado y diseminación de las células cancerosas (ACS, 1976; NCI, 1985).

La mayor parte de los cánceres (más del 90%) son carcinomas, es decir, tumores que se desarrollan a partir de células epiteliales. Los tumores malignos de los tejidos conectivo y de sostén (sarcomas), incluyendo a los de las células sanguíneas (leucemias) representan menos del 10% de los procesos cancerosos (Scautres, 1981).

Actualmente se conoce ampliamente la estrecha relación entre el cáncer en la población humana y la zona geográfica, la edad, la alimentación, la ocupación y la forma de vida en general (Cairns, 1978), incluyendo también costumbres sexuales (zur Hausen, 1987).

En 1980, el 8.4% de muertes en el mundo fueron debidas al cáncer. La región de Europa, la de América y la del Pacifico Occidental fueron las que presentaron los mayores porcentajes, siendo éstos del 17, 14 y 10% respectivamente. En estas mismas regiones, el cáncer ocupó uno de los tres primeros lugares como causa de defunción (WHO, 1984). En el mismo año, se estimó que el total de casos nuevos de cáncer en el mundo fue de 6.35 millones

divididos casi igualmente entre los dos sexos (3.25 millones en hombres y 3.10 millones en mujeres) y entre los países desarrollados y en desarrollo (3.13 y 3.22 millones de casos, respectivamente). En una población mundial de 4 450 millones, esto correspondió a una tasa de 143 por 100 000 habitantes por año. La mortalidad por cáncer es, sin embargo, fuertemente influenciada por la estructura de edad de la población. Así, las frecuencias crudas son considerablemente más altas en poblaciones con gran número de personas mayores, por lo que no dan una clara impresión de la importancia relativa del cáncer en diferentes partes del mundo (WHO, 1987). En 1985, el cáncer ocupó el segundo lugar de todas las causas de mortalidad en los países desarrollados, con una tasa de 2 por 1 000 habitantes, y en los países en vías de desarrollo ocupó el cuarto lugar como causa de mortalidad con una tasa de 0.75 por 1 000 habitantes (WHO, 1991).

En 1980, el cáncer de estómago (10.5%), el de pulmón (10.4%), el colon-rectal (9.0%), el mamario (9.0%) y el cérvico-uterino (7.3%) fueron los cinco tumores malignos más comunes en el mundo (WHO, 1987). Era sorprendente que aparecieran los dos últimos ya que éstos están confinados a un solo sexo. El cáncer mamario y el cérvico-uterino juntos, son responsables de un tercio de todos los casos nuevos de cáncer entre las mujeres. En los países desarrollados el tipo más alto de todos los casos nuevos de cáncer fue el cáncer mamario (22.9%), mientras que en los países en vías de desarrollo fue, con mucho, el cáncer cérvico-uterino (23.3%).

EL CANCER EN MEXICO

En México, se ha considerado que las estadísticas de neoplasias están subestimadas debido a errores y defectos del mecanismo establecido para la elaboración de las mismas, no revelando, por lo tanto, su verdadera magnitud; esto provoca que el sector salud no les preste la atención que merecen, afectando con ello la planeación y evaluación de las acciones que debería realizar en beneficio de la población (Fernández de Hoyos, 1983). Aun así, las cifras con que se cuenta muestran que a partir de 1954 las neoplasias malignas ocupan uno de los 10 primeros lugares como causa de defunción, escalando peldaños conforme pasaban los años (Olper Palacci, 1975), y para 1987 se consideró a los tumores malignos como la tercera causa principal de mortalidad en México y como la segunda causa de mortalidad por enfermedad, con una tasa de 45.1 por 100 000 habitantes (SS, 1990) que correspondió al 9.1% de todas las muertes. En 1986, la tasa de mortalidad por cáncer para hombres fue del 40.5 y para mujeres del 48.0 por 100 000 (7.3 y 11.3% respectivamente), observándose incrementos substanciales en los grupos de edad, conforme esta es mayor, que van para hombres desde 4.6 (de 5 a los 14 años) hasta 1 101.3 (de los 75 años en adelante) y para mujeres desde 3.6 (de 1 a los 14 años) hasta 858.3 (de los 75 años en adelante) por cada 100 000, y distinguiéndose casos de cáncer en todas las edades (WHO, 1989). Por lo tanto, el porcentaje de cáncer como causa de defunción aumentará en nuestro país en los próximos años, con el incremento del promedio de vida

de la población (ya que se observan incrementos importantes en la frecuencia de muertes por cáncer al aumentar la edad) y con la erradicación de las enfermedades infecciosas. Actualmente, las muertes por cáncer tienen un incremento mayor en comparación con el crecimiento demográfico general del país (Cisneros de Cárdenas et al., 1987).

El cáncer se presenta principalmente en personas de edad productiva, esto es, de los 30 años en adelante, siendo una de las 10 principales causas de mortalidad prematura (WHO, 1986). Además, en México en 1986, la probabilidad de eventualmente morir a causa de una neoplasia maligna fue de más de 1 por 10, tanto para hombres como para mujeres (WHO, 1991).

En el Distrito Federal, las estadísticas reportan que la mortalidad por tumores es de un 17.7%, observándose casos en todos los estratos sociales y ocupacionales (Leal Guerrero et al., 1985).

Además, hay que tomar en cuenta el enorme gasto económico y humano que se invierte en el tratamiento del cáncer (SS, 1990).

EL CANCER CERVICO-UTERINO (CaCU)

El útero, también llamado matriz, es el órgano en el cual un óvulo fecundado se implanta y se desarrolla hasta el momento del nacimiento. Durante el embarazo, el útero se expande, pero cuando una mujer no está embarazada, el útero es pequeño (alrededor de 7 centímetros de largo), hueco y en forma de una pera aplanada invertida. El extremo inferior del útero, angosto y que desemboca en la vagina, es el cuello del útero o cérvix. El cáncer que

empieza aquí se llama cáncer cérvico-uterino (CaCU), cáncer cervical o del cuello del útero (NCI, 1985).

En México, desde aproximadamente 1955, el CaCU ocupa uno de los 5 primeros lugares como causa de defunción por neoplasia (WHO, 1970) y desde alrededor de 1967 es la primera causa de mortalidad por cáncer en la mujer mexicana (Cisneros de Cárdenas et al., 1987). En 1986 el CaCU alcanzó una tasa de mortalidad del 8.9 por 100 000 habitantes (18.6% de los cánceres de mujer y 10.1% del total de los cánceres), siendo la neoplasia de más alta mortalidad para la mujer en México (WHO, 1989). Otra característica del CaCU es que a partir de los 15 a 24 años de edad aumentan los casos de muerte de manera espectacular, justamente al empezar la vida sexual de las mujeres, así como los cambios hormonales propios de la edad; y a partir de los 25 a 34 años es el cáncer de más alta mortalidad en la mujer (hasta los 65 a 74 años), y el de más alta mortalidad de todos los cánceres en México hasta los 55 a 64 años (WHO, 1970, 1989).

Como se puede notar, el CaCU ha ocupado tradicionalmente en México el primer lugar como causa de mortalidad por cáncer en la mujer, constituyendo un serio problema de salud pública. Además, su frecuencia es siempre ascendente, lo que revela las necesidades de ampliar la cobertura de los Programas Nacionales de Prevención y Detección Oportuna, ya que en 1981 sólo el 15% de la población fue objeto de detección en todo el sector salud (Cisneros de Cárdenas et al., 1987).

HISTORIA NATURAL DE LA NEOPLASIA INTRAEPITELIAL CERVICAL

Se considera que la lesión premaligna o precursora del cáncer de cérvix es la neoplasia intraepitelial cervical (NIC) la cual abarca también, en otra terminología a la displasia y al carcinoma *in situ* (CIS), dependiendo del grado de desarrollo (Figura 1). Las displasias se caracterizan por estar compuestas de células anormales en proliferación que no involucran el espesor total del epitelio. Estas células varían en tamaño y forma, los núcleos son pleomórficos e hiper cromáticos y hay un patrón en el tejido de pérdida de polaridad y desorientación celular generalizada (Reagan et al., 1953). El grado de NIC y de displasia está basado en la proporción del epitelio que está ocupada por las células indiferenciadas (Richart, 1967; Jenson y Lancaster, 1990). La NIC I, o displasia leve, está compuesta de células basiloideas desordenadas que ocupan el espesor del tercio más inferior del epitelio estratificado. La NIC II, o displasia moderada, está compuesta de células indiferenciadas que ocupan los dos tercios inferiores del epitelio. NIC III abarca las displasias severas y el CIS. Las displasias severas involucran el espesor casi total del epitelio, excepto las células más superficiales, las cuales muestran evidencia de maduración. Por otra parte, el CIS esta compuesto de células indiferenciadas que ocupan el espesor total del epitelio. Las lesiones premalignas finalmente terminan en carcinoma invasor (en diversos estadios) cuando las células neoplásicas del epitelio cervical han atravesado la membrana basal e invadido el tejido subyacente.

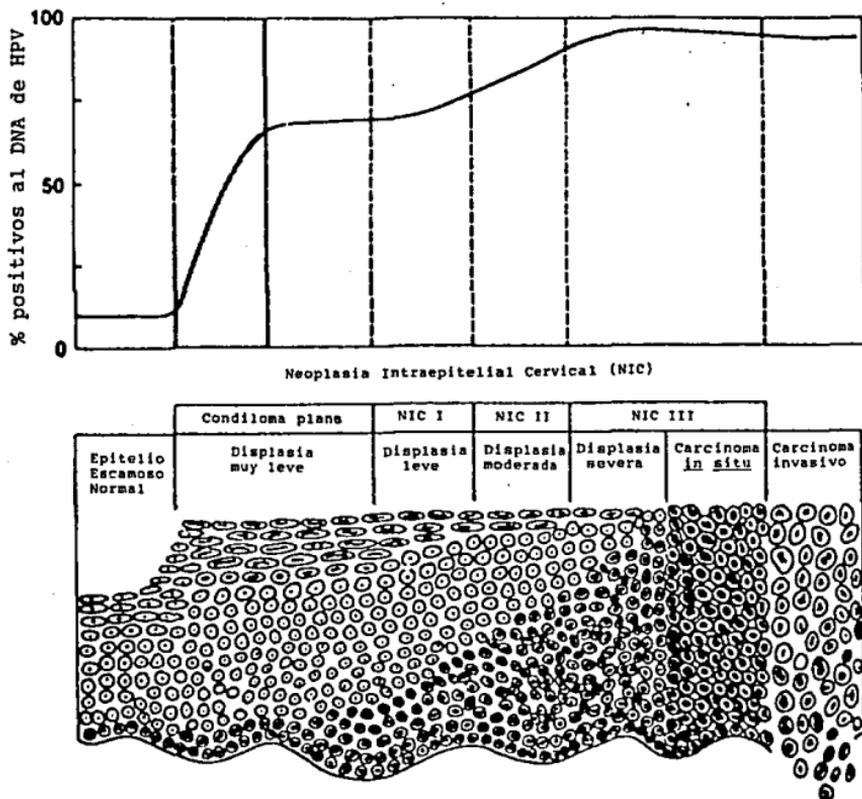


Figura 1. La frecuencia de la infección por el papilomavirus humano (HPV) en cervix (mediante la detección del DNA de HPV con la técnica de "Southern blot") está correlacionada con el epitelio normal y la aparición de lesiones benignas, premalignas y malignas. La mitad inferior de la figura muestra los cambios histológicos que ocurren en el epitelio escamoso del cervix y que progresan desde condiloma plano a carcinoma escamoso invasivo. La mitad superior representa el porcentaje de epitelio normal y de lesiones que son positivas al DNA de HPV. Los cervix normales de aproximadamente el 10% de mujeres sexualmente activas tienen infecciones latentes por HPV y hasta el 90% de CaCUs son positivos a DNA de HPV. (Tomado de Jenson y Lancaster, 1990.)

La evolución de estas lesiones a estadios invasores no es inevitable y depende del individuo. Hay lesiones preinvasoras que regresan o permanecen inalterables durante toda la vida, y sólo un porcentaje pequeño progresa hacia CaCU; el tiempo de evolución desde NIC I a NIC III, y de éste a carcinoma invasor, es muy variable, generalmente de 10 a 20 años, siendo la edad promedio de las mujeres que presentan NIC I y carcinoma invasor de 25 y 50 años, respectivamente (García-Carrancá y Gariglio, 1993).

Las verrugas genitales (condylomata acuminata) pueden convertirse también en carcinomas de células escamosas de la vulva, el pene o la región perianal. Esta conversión requiere usualmente periodos de 5 a 40 años (zur Hausen, 1980).

Las neoplasias intraepiteliales de otros sitios anogenitales, además del cérvix, tales como la vagina, la vulva, el pene y el periano, son lesiones morfológicamente similares a la NIC y han sido clasificados de manera similar (Jenson y Lancaster, 1990).

LEUCEMIAS

La leucemia se define como la proliferación incontrolada o la expansión de células hematopoyéticas que no retienen la capacidad para diferenciarse normalmente a células sanguíneas maduras. La mayoría de las leucemias han sido agrupadas clásicamente como linfoides o mieloides (Sawyers et al., 1991).

En México, desde aproximadamente 1955, la leucemia ha ocupado uno de los 10 primeros lugares de mortalidad de todos los cánceres (WHO, 1970). En 1986, estuvo entre las 5 principales causas de mortalidad por cáncer (6.3%), con una tasa de 3.1 en

hombres y de 2.5 en mujeres por cada 100 000 (7.6 y 5.2% respectivamente del total de muertes por cáncer) (WHO, 1989). En todos los casos la leucemia ha ocupado siempre el primer lugar como causa de mortalidad por cáncer en ambos sexos desde los 0 hasta los 15-24 años (WHO, 1970, 1989), siendo por lo tanto, el principal tipo de cáncer que afecta a niños y a adultos jóvenes.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA), también llamada leucemia linfocítica aguda o leucemia linfática aguda, es el tipo principal de leucemia que afecta a niños (NCI, 1984). Las células anormales recuerdan a los glóbulos blancos llamados linfocitos. Estos son células que participan en establecer la respuesta del sistema inmune (Paul, 1984). Frecuentemente la leucemia linfoblástica aguda en niños aparece de repente y progresa rápidamente. Los nódulos linfáticos, el bazo y el hígado son infiltrados con glóbulos blancos y pueden agrandarse (NCI, 1984).

MARCO TEORICO.

BIOLOGIA MOLECULAR DEL CANCER

El concepto de que el cáncer es una enfermedad genética (Bishop, 1991), es ahora más fuerte que nunca. La idea se desarrolló de diversas raíces (Bishop, 1987a,b): el reconocimiento de predisposiciones hereditarias al cáncer (Ponder, 1990), la detección de cromosomas dañados en al menos algunas células cancerosas -muchos tumores son consistentemente homocigotos para defectos genéticos específicos tales como translocaciones cromosomales, amplificaciones genéticas o mutaciones puntuales- (Yunis, 1983), la aparente conexión entre

susceptibilidad a cáncer y la capacidad declinada de las células para reparar el DNA dañado (Hanawalt y Sarasin, 1986), y la creciente evidencia que relaciona el potencial mutagénico de sustancias a su carcinogenicidad (Ames, 1979). Las causas del cáncer son muchas pero, como se observa, todas pueden jugar sobre un substrato genético común dentro de la célula.

ONCOGENES

Se han reunido evidencias de que el cáncer surge vía un proceso multifactorial (Land et al., 1983a,b; Weinberg, 1989; Levine y Momand, 1990). El daño genético encontrado en células cancerosas es de dos clases: dominante, con blanco en los proto-oncogenes (Bishop, 1991); y recesivo, con blanco en los conocidos como anti-oncogenes (también llamados genes supresores de tumores, genes supresores del crecimiento u oncogenes recesivos), que de las funciones de sus productos todavía se sabe muy poco (Marshall, 1991). En el primer caso, los alelos silvestres son llamados proto-oncogenes (u oncogenes celulares normales, c-onc) y los genes mutantes correspondientes son conocidos como oncogenes (Varmus, 1984). Algunos de los oncogenes (los cuales son versiones alteradas de genes que en su forma normal son muy importantes, algunos especialmente en el desarrollo de un organismo) pueden servir para iniciar la génesis de tumores, otros para mantener el fenotipo neoplásico final, algunos pueden servir para cualquiera de los dos propósitos en contextos diferentes (Land et al., 1983a; Hunter, 1991). La inducción de su expresión puede ser el resultado de la exposición a agentes

carcinogénicos tales como radiación -luz ultravioleta (UV) en malignidades de la piel (Sarasin, 1981)-, químicos -tabaquismo en cáncer de pulmón (Braval y Slomianski, 1981; WHO, 1988; Henderson et al., 1991)- o virus -retrovirus (Bishop, 1982b) y virus de DNA: el virus de Epstein-Barr (EBV), el virus de la hepatitis B (HBV), el virus linfotrópico de las células T (HTLV-I y II) y el papilomavirus humano (HPV)- (zur Hausen, 1989b, 1991).

Más que cualquier orden específico de los eventos que son requeridos, es la suma de estos eventos lo principal en la carcinogénesis (Hunter, 1991). Está llegando a ser claro que hay más de un punto de decisión regulado en el ciclo celular, y que estos puntos de rechazo pueden ser los blancos para la acción de los oncogenes. Varios trabajos dan demostración directa del poder limitado de un solo oncogene, y de la necesidad de la interacción cooperativa entre diferentes oncogenes (Land et al., 1983b; Ruley, 1983). Esto sugiere que cada oncogene es especializado para inducir parte de los fenotipos requeridos para la transformación completa (Rassoulzadegan et al., 1982). En general, hay pocas razones para creer que in vivo un oncogene solo puede generar células tumorigénicas (Weinberg, 1989). Además, se tiene evidencia de la cooperación entre oncogenes retrovirales (Palmieri, 1989).

El estudio de las proteínas transformantes de virus tumorales de DNA ha sido muy revelador y apoya fuertemente la idea de que la cooperación es una característica esencial de la carcinogénesis. Un tema que emerge entre estos virus es que las

oncoproteínas virales codificadas por ellos interactúan específicamente con proteínas celulares reguladoras y que los efectos oncogénicos de estos virus son, al menos en parte, una consecuencia de estas interacciones específicas (Dyson et al., 1989; Scheffner et al., 1990).

VIRUS Y CANCER

Actualmente, existen muchos ejemplos de virus carcinogénicos (Feunteun, 1981; Bishop, 1983, 1985; zur Hausen, 1991). La existencia de virus tumorales se sospechó por primera vez a principios de siglo. En 1910 Peyton Rous demostró que un filtrado libre de células proveniente de sarcomas de pollo, podía inducir nuevos sarcomas en dichas aves. Décadas después, se pudo demostrar sin ambigüedad la existencia de un virus y este fue llamado virus del sarcoma de Rous (Bishop, 1982a). A la fecha se han descubierto muchos otros retrovirus que son carcinogénicos (Bishop, 1983). Los genes v-onc (oncogen vírico) llevados por los retrovirus así como los genes celulares homólogos (c-onc), se denominan mediante un código de tres letras, que recuerdan el tumor de origen (Bishop, 1983; Dulbecco, 1983). Así, hay un gen llamado "src" (por sarcoma) en el virus del sarcoma de Rous y en otros virus sarcomatogénicos; un gen "myc" (por mielocitomatosis) en el virus de la mielocitomatosis aviar, etc. Hay que señalar que estos genes son distintos entre sí.

Asimismo, los trabajos sobre los virus tumorales de DNA están muy adelantados. Sus "genes cancerígenos" se manifiestan claramente en la mayoría de ellos (Feunteun, 1981). Estos son en

el virus de simio 40 (Simian Virus 40 o SV40) los genes para los antígenos T grande y pequeño, en el virus del poliooma los genes para los antígenos T grande, mediano y pequeño, y en el adenovirus los dominios E1A y E1B (Bishop, 1985). Sin embargo, estos virus inducen tumores en roedores que no son sus huéspedes naturales (Fried y Prives, 1986; Pettersson y Roberts, 1986).

En ciertos cánceres de humano también se han encontrado involucrados varios virus como en el caso del EBV (Gómez García, 1984) para el linfoma africano de Burkitt y en cáncer nasofaríngeo (Becker, 1980; Liebowitz et al., 1990), el HBV (Tiollais y Dejean, 1986) en el hepatocarcinoma (Sherman y Shafritz, 1990), los HTLV-I y II (Gallo, 1987) en leucemias de células T de adultos (Reitz, 1990), y el HPV en cáncer anogenital (zur Hausen, 1985, 1987, 1989b, 1991; Broker y Botchan, 1986).

Actualmente se distinguen sólo tres vías bioquímicas por las que los productos de los oncogenes virales deben actuar (Bishop, 1985): i) Fosforilación, con proteínas y fosfolípidos como sustratos potenciales (Hunter y Cooper, 1985). ii) Iniciación de la síntesis de DNA (Martin, 1981). iii) Regulación de la transcripción (Kingston et al., 1985).

LOS PAPILOMAVIRUS (PVs)

Los PVs comprenden una familia de pequeños virus de DNA, los cuales inducen tumores epiteliales o fibroepiteliales de la piel o mucosa de vertebrados superiores. Estos tumores, llamados papilomas o verrugas, son generalmente benignos, muestran un crecimiento limitado y frecuentemente regresión espontánea

(Rulison, 1942; Massing y Epstein, 1963). Sin embargo, ciertos miembros de la familia de papilomavirus inducen tumores que pueden progresar a carcinomas epiteliales malignos, comúnmente después de un largo período de latencia (Sousa et al., 1990).

Los PVs exhiben un número restringido de hospederos. Todos infectan específicamente al epitelio siendo estrictamente epiteliotrópicos. El epitelio escamoso es estratificado y en él se puede observar un gradiente de diferenciación desde las células precursoras no diferenciadas de la capa basal hasta las células terminalmente diferenciadas de la capa externa, pasando estas últimas a través de un programa de diferenciación que involucra cambios en la expresión genética de la queratina. Las capas sucesivas del epitelio queratinizado (como el de la piel) son la capa basal, la capa suprabasal, el estrato espinoso, el estrato granuloso y el estrato córneo. La infección por PVs se realiza presumiblemente por acceso directo a las células basales expuestas en una herida o por abrasión. El ciclo viral completo de los PVs parece estar enlazado al programa de diferenciación de la célula epitelial (Taichman y LaPorta, 1987). La expresión de los productos genéticos virales derivados de la que ha sido clasificada como la región temprana o transformante del genoma ha sido detectada en las células más inferiores de la epidermis por hibridización in situ. La expresión de la región tardía del genoma viral (la cual codifica las proteínas estructurales del virus) así como el ensamblaje de las partículas víricas, ocurre solamente en las capas terminalmente más diferenciadas de la

epidermis (Spalholz y Howley, 1989).

Los epitelios susceptibles y el tipo de lesión difieren entre los diferentes PVs, dando lugar a síntomas clínicos distintos dependiendo del virus infectivo (de Villiers, 1989). El hecho de que todos los genomas de PVs exhiban una organización funcional muy similar podría explicar el porque todos los miembros de la familia comparten una especificidad epitelial común, pero confunde el esfuerzo para entender el porque diferentes miembros muestran tan grandes variaciones en la clase de hospedero y en el potencial oncogénico. La diversidad de tipos de PVs individuales deriva en parte de propiedades inherentes al genoma viral y en parte de la especificidad de la interacción entre el virión y la célula huésped. La propagación exitosa de virus en cultivos de tejidos no ha sido lograda todavía (Sousa et al., 1990).

CLASIFICACION

Los PVs forman un género de la familia Papovaviridae; el otro género lo forman el poliomavirus y el SV40, entre otros (Melnick, 1962; Melnick et al., 1974). Consisten de partículas icosaedrales pequeñas (55 nm de diámetro) con 72 capsómeros, formadas sólo de proteínas y una sola molécula de DNA circular de doble cadena que promedia 7.8 kilopares de bases (kpb) y con peso molecular de aproximadamente 5×10^6 . Las partículas víricas tienen un peso de 28×10^6 daltones, un coeficiente de sedimentación, $S_{20,w}$, de 300 y una densidad en cloruro de Cesio o de Rubidio de 1.34 g/ml (zur Hausen, 1980; Pfister, 1987). La clasificación de los PVs está basada en en la homología de DNA y en el tipo del hospedero.

Menos del 50% de similitud de DNA viral heterólogo con otros tipos de PVs conocidos, define tipos independientes y más del 50%, pero incompleta homología, será considerado un subtipo de un previo aislado (Coggin y zur Hausen, 1979). A la fecha, han sido identificados alrededor de una docena de PVs en animales vertebrados, incluyendo a aves y a una amplia gama de mamíferos (Lancaster y Olson, 1982; Pfister, 1984; Campo y Jarrett, 1987; Olson, 1987; Sundberg y O'Banion, 1989); y más de 60 PVs humanos, de los que aproximadamente 20 están asociados con lesiones del tracto anogenital (de Villiers, 1989). Además, muchos subtipos y variantes han sido caracterizados (Sousa et al., 1990).

ORGANIZACION DE LOS GENOMAS DE PVs

Aunque existe un grado moderado de homología entre los genomas de PVs humanos y animales (Law et al., 1979; Heilman et al., 1980), todos tienen muchas propiedades en común, lo cual válida la utilización de BPV-1 como modelo. En particular, todos los PVs exhiben una organización similar del genoma que consiste de al menos 10 secuencias codificadoras de proteínas o marcos de lectura abierta (open reading frame u ORF), todos en la misma cadena de DNA (Pettersson et al., 1987). Esto coincide con la observación de que todos los mRNA virales que han sido detectados son codificados por esta cadena (Amtmann y Sauer, 1982; Freese et al., 1982; Heilman et al., 1982; Engel et al., 1983).

Los genomas de los PVs pueden ser divididos funcionalmente en dos regiones codificadoras separadas por un segmento no codificador de 0.4-1.0 kilobases (kb). La región codificadora E

(early o temprana) contiene los genes tempranos E1 a E8, los cuales participan en la replicación viral y en la transformación celular. Este resultado es derivado de estudios de la región E de BPV-1: un fragmento HindIII-BamHI de 5.6 kb que comprende 69% del genoma, es suficiente para la transformación *in vitro* y la replicación extracromosomal (Lowy et al., 1980). La región codificadora L (late o tardía) contiene los genes tardíos L1 y L2, los cuales codifican para proteínas estructurales de la partícula viral y son expresados solamente en células diferenciadas. La región no codificadora está localizada entre el fin del ORF L1 y el comienzo del ORF E6 y presenta características como regiones ricas en AT, varios promotores para la RNA polimerasa II, potenciadores (enhancers) transcripcionales constitutivos e inducibles (Gius et al., 1988), sitios de unión para factores celulares de transcripción, así como varias copias del palíndromo ACCN₆GGT, que es sitio de unión para la proteína viral reguladora de la transcripción E2 (Ham et al., 1991). Esta región involucrada en el control de la expresión genética viral es llamada comúnmente región larga de control (long control region o LCR) o región reguladora corriente arriba (upstream regulatory region o URR) (Sousa et al., 1990).

Tabla 1. Funciones de los genes de papilomavirus

ORF	Funcion(es)
E1	modulador negativo de la replicación (porción 5') en BPV-1 requerido para la replicación temprana (porción 3') en BPV-1
E2	requerido (porción 3') para el establecimiento del genoma viral como un plásmido nuclear estable
E3	transregulador transcripcional de promotores en la LCR
E4	efecto indirecto sobre la replicación y la transformación transactivación, unión a DNA (proteína completa) en BPV-1
E5	transrepresión, unión a DNA (porción 3') en BPV-1
E6	desconocida
E7	proteína citoplasmática, predominante en verrugas (HPV-1) y en células infectadas productivamente
E8	asociado con la maduración del virión para HPV-1
L1	funciones "tardías"
L2	gene transformante en BPV-1 y en HPV-16
L3	gene transformante en HPV-16 y 18
L4	unión a la proteína celular p53 (HPV-16 y 18)
L5	control de copia del plásmido en BPV-1
L6	gene transformante en HPV-16, 18 y CRPV
L7	unión a la proteína celular pRb (HPV-16)
L8	regulación transcripcional en HPV-16
L9	control de copia del plásmido en BPV-1
L10	replicación en BPV-1
L11	regulación transcripcional
L12	desconocida para otros PVs
L13	proteína mayor de cápside
L14	proteína menor de cápside

ORF: marco de lectura abierta; BPV: papilomavirus bovino; LCR: región larga de control; HPV: papilomavirus humano; CRPV: papilomavirus del conejo de cola de algodón; PVs: papilomavirus. (Tomado de Campo, 1988, Schlegel, 1990, Sousa et al., 1990, Spalholz y Howley, 1989, Leechanachai et al., 1992 y Pim et al., 1992.)

PAPILOMAVIRUS HUMANOS Y CANCER ANOGENITAL

La epidemiología del cáncer anogenital muestra una indudable correlación con la actividad sexual (Rotkin, 1973; Kessler, 1976; Holly et al., 1989) sugiriendo que en el desarrollo del CaCU está involucrado un factor viral transmitido sexualmente. Algunos virus han sido detectados en lesiones de CaCU: el virus herpes simple tipo 2 o HSV-2 (Rawls et al., 1968; Goldberg y Gravel, 1976) y más recientemente los papilomavirus humanos (human papillomaviruses o HPVs) (zur Hausen, 1987, 1989b). Sin embargo, desde hace algún tiempo han surgido evidencias experimentales que indican que el virus del herpes no es el principal candidato etiológico del CaCU (Vonka et al., 1987).

El papel de los PVs en la etiología de neoplasias epiteliales fue demostrado primero en estudios del papilomavirus del conejo de cola de algodón (cottontail rabbit papillomavirus o CRPV), donde hasta un 75% de los tumores inducidos por CRPV en conejos domésticos y 25% en los conejos cola de algodón progresaron a la malignidad (Kidd y Rous, 1940; Syverton, 1952; Olson, 1987).

Existen otros PVs tales como el papilomavirus bovino tipo 1 (bovine papillomavirus type 1 o BPV-1), el cual es capaz de inducir tumores fibroblásticos en ratones y hamsters (Boiron et al., 1964; Breitbart et al., 1981) y de transformar tanto tejidos de roedores como de bovino, cultivados *in vitro* (Thomas et al., 1964; Gerald, 1969; Meischke, 1979; Dvoretzky et al., 1980; Binétruy et al., 1982).

La posible asociación directa entre HPV y CaCu se puso de

manifiesto con el aislamiento del DNA del HPV tipo 6, proveniente de una verruga genital humana o condiloma acuminado (Gissmann y zur Hausen, 1980).

La infección por HPV ocurre solamente en células basales del epitelio, las cuales pueden dividirse; en éstas, el virus no se replica y permanece en estado latente. A medida que las células epiteliales se diferencian, el DNA viral se replica, se transcribe y forma viriones completos. Esto sugiere que factores de la diferenciación de los epitelios participan en la regulación del ciclo viral. Durante la diferenciación celular, las células se vuelven más y más permisivas para la replicación viral. Ésta puede observarse en las capas suprabasales, mientras que las proteínas estructurales y las partículas virales aparecen sólo en las capas superiores (García-Carrancá y Gariglio, 1993).

Al infectar las mucosas genitales, los HPV inducen frecuentemente a la coilocitosis, el signo patognomónico en la citopatología e histopatología de las infecciones genitales provocadas por HPV, que consiste en células anormales del epitelio mucoso, que se caracterizan por una gran zona clara perinuclear, y por presentar anomalías del núcleo, como hiper cromasia, cariorrexis, picnosis y a menudo binucleación. En algunos coilocitos y condilomas pueden aparecer antígenos virales de la cápside en el núcleo de las células superiores del epitelio (Morin et al., 1981).

Algunos de los HPVs, tales como los HPV-6 y HPV-11, son considerados virus de bajo riesgo ya que están asociados con

lesiones proliferativas benignas tales como condylomata acuminata (las cuales progresan a malignidad infrecuentemente) en un 90%, en alrededor de un tercio de todos los papilomas orales y raramente en carcinomas (Gissmann et al., 1983; McCance et al., 1983; zur Hausen, 1987). Otros, que incluyen a los HPV-16, HPV-18, HPV-33 y HPV-52, son considerados HPVs de alto riesgo debido a su elevada asociación con lesiones potencialmente neoplásicas y con ciertos carcinomas anogenitales, más notablemente con el cáncer cérvico-uterino, mientras que el HPV-31 es considerado de riesgo intermedio y el HPV-35 es estimado como papilomavirus humano de baja prevalencia en cánceres anogenitales (4%) (Lőrincz et al., 1987), al igual que otros como los HPVs tipo 39, 45, 51, 56, 58 y 61 (zur Hausen, 1991). Los DNAs de los HPV-16 y HPV-18 se encuentran en el 60 a 80% de cánceres cervicales (más frecuentemente el DNA del HPV-16) (zur Hausen y Schneider, 1987) y en el 15% de cánceres escamosos de ano (Beckmann et al., 1989).

Secuencias homólogas al DNA del HPV-16 se han encontrado en muestras de carcinoma cervical, con una frecuencia variable en diferentes países. El DNA del HPV-16 se detectó en 17% de los carcinomas cervicales invasivos analizados en los Estados Unidos (Fukushima et al., 1985), pero en 60% de los cánceres cervicales colectados en Alemania; además, biopsias de cáncer cervical de Kenya y Brasil revelaron DNA del HPV-16 en alrededor del 35% de casos (Dürst et al., 1983), mientras que la incidencia de DNA de HPV-16 en Inglaterra (Scholl et al., 1985) es intermedia (45%), con respecto a los de Alemania y los de Kenya y Brasil, al igual

que en Italia (47%) (di Luca et al., 1986), y en Japón fue de alrededor del 33% (Yoshikawa et al., 1985; Tsunokawa et al., 1986). También biopsias de cáncer vulvar y penil han hibridizado al DNA del HPV-16 con una frecuencia de alrededor del 25% de los casos (Dürst et al., 1983) y en 14% de las neoplasias escamosas de ano (Beckmann et al., 1989). En México, secuencias de DNA del HPV-16 se presentaron en aproximadamente el 31% de tumores cervicales (Gariglio et al., 1987; González-Garay et al., 1989). Por otro lado, el DNA de HPV-18 se ha demostrado por hibridización tipo Southern bajo condiciones de alta astringencia, en alrededor del 25% de carcinomas cervicales de África y Brasil, en 15% de los tumores cervicales de Alemania y en 10% de los carcinomas de pene (Boshart et al., 1984).

Se postula que los HPVs de alto riesgo desempeñan un papel en la patogénesis de las NICs y del cáncer anogenital, particularmente en cáncer del cervix, con base en los siguientes puntos (zur Hausen, 1991): 1) El DNA viral transcripcionalmente activo es encontrado en cerca del 90% de tales tumores, 88% de todos los carcinomas de células escamosas y 83% de todos los adenocarcinomas del cervix (Gissmann y Schneider, 1986; Schreier y Gruber, 1987). 2) La mayoría de los tumores positivos a virus contienen el DNA viral integrado. El episoma viral circular se rompe dentro de una región específica (el ORF E2) para la integración (Choo et al., 1987). Un patrón consistente no ha sido observado para localizaciones intracromosomales. Un pequeño porcentaje de tumores malignos llevan copias no integradas de DNA

viral (Matsukura et al., 1989; Cullen et al., 1991). 3) La vasta mayoría de las biopsias de cáncer positivas a HPV, así como líneas celulares que contienen HPV y que derivaron de mujeres con cáncer cervical (CaSki, SiHa, HeLa, SW 756, C4-1 y 2 y MS751), revelan transcriptos específicos que se originan uniformemente de dos marcos de lectura abierta específicos (los oncogenes E6 y E7) del DNA del HPV (Schwarz et al., 1985; Yee et al., 1985; Smotkin y Wettstein, 1986). Existen otras evidencias que implican a la infección por HPV en neoplasias genitales (di Luca et al., 1986):

4) Observaciones histológicas muestran que el 70% de displasias cervicales, así como tejidos malignos, pueden estar asociados con células coilocitóticas, las cuales contienen moléculas del virus (Pilotti et al., 1981, 1982; Fu et al., 1983).

5) Proteínas estructurales de HPV pueden ser detectadas en un alto porcentaje de NICs por técnicas inmunohistoquímicas (Syrjänen, 1983; Dyson et al., 1984; Pilotti et al., 1984).

6) Lesiones por HPV en el tracto genital pueden sufrir transformación maligna (Syrjänen et al., 1985).

7) PVS de animales tienen potencial oncogénico (Gissmann, 1984).

8) Anticuerpos contra antígenos específicos del grupo de PVS fueron detectados en grado significativo en sueros de pacientes con NICs y CaCU con respecto a controles (Baird, 1983; Jochmus-Kudielka et al., 1989). Además, 9) hay una gran similitud histológica y colposcópica entre displasia cervical temprana y tejido infectado por HPV (Schreier y Gruber, 1987).

10) El DNA de HPV es encontrado en metástasis con origen en tumores cervicales infectados con el virus (Fuchs et al., 1989).

Recientemente, los HPVs 16, 18, 31 y 33 y específicamente sus ORFs E6 y E7 (y también E5 de HPV-16), han mostrado un potencial oncogénico in vitro al alterar la diferenciación de células epiteliales (McCance et al., 1988), immortalizar queratinocitos (Pirisi et al., 1987; Woodworth et al., 1989; Sedman et al., 1991) y transformar fibroblastos humanos (Pirisi et al., 1987; Watanabe et al., 1989), así como fibroblastos de roedor (Bedell et al., 1987, 1989; Watanabe y Yoshiike, 1988; Sedman et al., 1991; Leechanachai et al., 1992; Pim et al., 1992), mientras que los HPVs 1a, 5, 6 y 11 no mostraron tales efectos (Schlegel et al., 1988; Woodworth et al., 1989; Halbert et al., 1991). En muchos de estos reportes se transfectó el DNA viral clonado en vehículos de expresión con promotores heterólogos fuertes. El DNA y el RNA virales persistieron en el estado transformado.

Además del HPV, existen otros factores adicionales implicados en la carcinogénesis anogenital: el virus herpes simple (herpes simplex virus o HSV), y tal vez el citomegalovirus humano (mutando el DNA de la célula hospedera o amplificando el genoma del HPV, respectivamente), el tabaquismo (componentes del tabaco aparecen concentrados en el fluido vaginal, pudiendo ser convertidos en nitrosaminas carcinogénicas en presencia de infecciones bacterianas específicas), inflamaciones crónicas de los genitales, condiciones higiénicas pobres, fimosis, anticonceptivos orales y hormonas (se ha observado estimulación hormonal para el HPV) (zur Hausen, 1989b; Sousa et al., 1990; Ley et al., 1991). Así, algunos tipos específicos de HPV parecen ser

un factor necesario pero no suficiente, al menos, para el desarrollo de carcinomas anogenitales.

BIOLOGIA MOLECULAR DE LOS PAPILOMAVIRUS HUMANOS

De los 60 HPVs aislados a la fecha, 10 han sido secuenciados (HPVs tipo 1, 5, 6, 8, 11, 16, 18, 31, 33 y 52) y muestran fuertes similitudes con el genoma del BPV-1 (de Villiers, 1989). Las partículas virales contienen sólo DNA y proteínas. El DNA de los HPVs es circular, de doble cadena, y contiene aproximadamente 7 900 pares de bases (pb); está enrollado con histonas, condensado en nucleosomas y encapsulado en un virión icosaedral con 72 capsómeros. Los genomas virales presentan una estructura básica muy parecida, con similitud de secuencia entre ellos que va de moderada (45%) a alta (85%) (Giri y Danos, 1986). Se han identificado marcos de lectura abierta (ORF), organizados en regiones de expresión temprana (E) y tardía (L), ambas de longitud casi igual (Figura 2). Los primeros codifican para proteínas relacionadas con la replicación (E1), transcripción (E2), y transformación celular (E6 y E7); los segundos codifican proteínas de la cápside (L1 y L2). La información genética se encuentra codificada en una sola de las cadenas del DNA y los genes tienen la misma orientación transcripcional, con sobreposición de algunos de ellos. El genoma contiene una región de control (no codificadora) de aproximadamente 1 kb, la LCR, en la que se han identificado secuencias estimuladoras y represoras de la transcripción viral, así como el origen de la replicación.

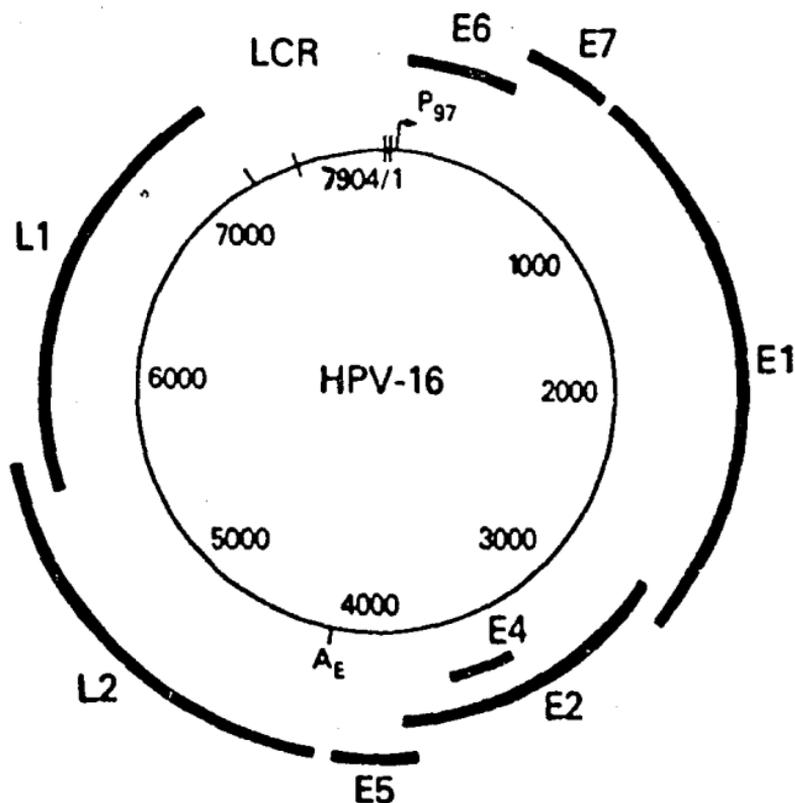


Figura 2. Organización genómica del HPV-16. Su genoma consiste de un DNA circular de doble cadena con 7 904 pares de bases. Se ilustran los genes tempranos (E1 a E7) y los tardíos (L1 y L2) así como la región larga de control (LCR) en la cual se encuentran los "enhancers" y los elementos de respuesta a E2 y a glucocorticoides-progesterona. El promotor P₉₇ es responsable de la transcripción de todos los mRNA virales tempranos. (Tomado de Schlegel, 1990.)

LOS PAPILOMAVIRUS HUMANOS DE ALTO RIESGO (HPV-16 y HPV-18)

Entre el 60 al 80% de los casos de cáncer cervical, sumando el vulvar y el penil, tienen asociados al HPV-16 ó 18 (zur Hausen y Schneider, 1987) y de aquellos, el 40 a 60% contienen HPV-16.

En el caso de los HPVs oncogénicos, secuencias del DNA viral son generalmente encontradas integradas en el genoma celular de biopsias cancerosas, mientras que el DNA viral de tipos malignos y no malignos persiste extracromosomalmente como un episoma en lesiones precancerosas (Cullen et al., 1991). En lesiones malignas el DNA de HPVs de alto riesgo puede estar integrado en el genoma celular en copias sencillas o múltiples y en tumores benignos se encuentra como episoma (Dürst et al., 1985). Los sitios de inserción de estos HPVs en el DNA celular, al parecer son muy variados y no siguen un patrón característico. En algunas líneas celulares derivadas de carcinomas genitales, el DNA de los HPVs se ha encontrado insertado cerca de proto-oncogenes celulares, como c-src, c-raf y c-myc (Dürst et al., 1987a; Gariglio et al., 1987); esto sugiere que la inserción de secuencias virales cerca de proto-oncogenes celulares puede activar a estos últimos en posición cis (Campo, 1988). Sin embargo, en la mayoría de los carcinomas invasores y líneas celulares derivadas de CaCU que contienen el HPV-16 ó 18, se encuentran transcritos de la región E6, E6* (generado por el procesamiento alterno del mRNA de E6) y E7; esto sugiere que dichas regiones forman parte de un mecanismo de transformación en posición trans y son importantes para la permanencia del tipo

maligno (Schwarz et al., 1986; Takebe et al., 1987). El producto del gen E6* parece ser muy importante ya que los tipos virales de potencial benigno no lo producen (Schreier y Gruber, 1987; Schlegel, 1990).

Por otra parte, se ha observado que cuando se fusionan células HeLa (línea celular derivada de un CaCU, cuyo DNA contiene el genoma de HPV-18 insertado) con células normales, los híbridos resultantes al crecer en medio de cultivo, continúan presentando el fenotipo maligno y expresando los genes E6 y E7; sin embargo, dejan de crecer y de expresar E6 y E7 cuando se inoculan en ratones atímicos (Stanbridge et al., 1982; zur Hausen, 1987). Estos datos sugieren la existencia en las células normales, de un mecanismo de control negativo para los genes tempranos del HPV, presumiblemente regulado por un factor humoral (zur Hausen, 1986, 1987) y apoyan el concepto por el cual el desarrollo de los diferentes cánceres humanos se da por lesiones genéticas sucesivas, con la participación de genes virales y celulares. De lo anterior se concluye que, durante el desarrollo del cáncer genital, aparte de la infección por HPV, se requiere de otros agentes que lesionen el DNA celular. Esto podría explicar la asociación de otros factores co-carcinogénicos (virus herpes simple, metabolitos mutagénicos del tabaco e inflamaciones crónicas de los genitales) encontrados en estudios epidemiológicos y además permitiría explicar los grandes períodos de latencia entre la infección primaria por HPV y el desarrollo del tumor así como el porqué el CaCU se desarrolla sólo en un

porcentaje pequeño de los individuos infectados (zur Hausen, 1986).

Los HPVs oncogénicos muestran algunos paralelos con el adenovirus y el SV40, ya que los tres codifican proteínas transformantes que pueden unirse con pRB (el producto del gene de susceptibilidad al tumor de retinoblastoma humano) (DeCaprio et al., 1988; Whyte et al., 1988; Dyson et al., 1989; Münger et al., 1989b) y con p53 (Lane y Crawford, 1979; Linzer y Levine, 1979; Sarnow et al., 1982; Werness et al., 1990), las cuales son consideradas como proteínas supresoras de tumores (Friend et al., 1986, 1987; Eliyahu et al., 1989; Finlay et al., 1989).

LOS ONCOGENES E6 Y E7

Un gran apoyo para el posible papel causal de los HPVs en el CaCU deriva del reconocimiento de que los papilomavirus humanos tipos 16 y 18 codifican oncoproteínas (Howley, 1991). Actualmente, existe evidencia experimental que sugiere que la transcripción activa de los genes integrados E6 y E7 es requerida para mantener el fenotipo transformado, aun en líneas celulares (Schlegel, 1990). Los genes E6 y E7 de estos HPVs de alto riesgo se conservan intactos durante la integración del DNA viral al genoma celular y sus productos son expresados regularmente en cánceres cervicales y en líneas celulares derivadas de estos últimos (Schwarz et al., 1985; Smotkin y Wettstein, 1986); las líneas celulares HeLa, C4-1 y SW 756, contienen integrado el DNA del HPV-18 y en ellos los oncogenes E6 y E7 son transcritos activamente, pero no así otros genes virales (Schwarz et al.,

1985, 1986; Schneider-Gädicke y Schwarz, 1986). Por otra parte, plásmidos que expresan mRNA antisentido de E6/E7 inhiben el crecimiento de la línea de carcinoma cervical C4-1 (von Knebel Doeberitz et al., 1988). También, células transformadas por la introducción de construcciones que expresan el gene E7 mediante la inducción con dexametasona, en ausencia de esta última pierden su capacidad proliferativa (Crook et al., 1989). Además, mutaciones en E6 o E7 anulan la transformación de queratinocitos in vitro, mientras que en E1, E2 y E4 no tienen efecto (Münger et al., 1989a).

Se ha sugerido (Cole y Danos, 1987), que E6 y E7 se originaron por duplicaciones de una unidad con 33 aminoácidos que contiene un doblete de cisteinas (Cys-X-X-Cys) repetido cuatro y dos veces respectivamente (Schlegel, 1990); estos residuos de cisteína participan en coordinar la unión de iones metálicos (tales como zinc) (Barbosa et al., 1989) y en activación transcripcional (Lamberti et al., 1990). Además, contribuyen a la actividad transformante de E7 pero no son esenciales (Edmonds y Vousden, 1989), mientras que cada una de las cuatro repeticiones es esencial para transformación en E6 (Vousden et al., 1989).

Los genes E6 y E7 han sido mejor estudiados en los HPV-16 y HPV-18. En queratinocitos y fibroblastos humanos primarios, se mostró que los oncogenes E6 y E7 son requeridos en combinación para la inmortalización y transformación eficiente de estas células (Hawley-Nelson et al., 1989; Münger et al., 1989a; Watanabe et al., 1989; Hudson et al., 1990; Sedman et al., 1991).

Los genes E6 y E7 del HPV-16 pueden complementar el gene correspondiente del HPV-18 para inmortalizar queratinocitos humanos, mientras que los mismos productos genéticos de los HPVs de bajo riesgo son incapaces de lograr sustituir el gene correspondiente de los HPV-16 ó 18 para la inmortalización eficiente (Barbosa et al., 1991).

El producto del gene E7 es la proteína viral más abundante en carcinomas cervicales y en líneas celulares que contienen DNA de HPV-16 o HPV-18 (Smotkin y Wettstein, 1986; Seedorf et al., 1987) y el mRNA está presente en lesiones premalignas donde el DNA de HPV existe como un episoma (Sousa et al., 1990), mientras que el mRNA empalmado de E7 no ha sido identificado en lesiones producidas por los HPV benignos 1, 6 y 11 (Chow et al., 1987b,c; Sousa et al., 1990). El extremo 5' de los mRNAs de E7 empieza directamente, o unos pocos nucleotidos antes, del supuesto codón de inicio de E6/E6*. Este arreglo puede ser un medio para regular la síntesis de E6 y E7, por cambio del ORF a E7, explicando esto su abundancia en relación con E6 (Sousa et al., 1990). La proteína E7 de HPV-16 ha sido la mejor estudiada: es una pequeña fosfoproteína citoplasmática (fosforilada en serinas por casein cinasa II), no glucosilada, de sólo 98 aminoácidos que une a zinc, y que migra anormalmente en geles de poliacrilamida con una movilidad lenta (Smotkin y Wettstein, 1986; Oltersdorf et al., 1987; Barbosa et al., 1989, 1990; Firzlaff et al., 1989). La proteína E7 de HPV-16 pesa 15 kd y la de HPV-18 12 kd, mientras que los valores esperados de las secuencias de DNA son de 11 y 12

kd respectivamente; se han localizado en el citoplasma (Seedorf et al., 1987), aunque otros reportes sugieren que son nucleares (Sato et al., 1989).

Las proteínas E7 codificadas por los HPVs genitales oncogénicos, comparten ciertas características con E1A de adenovirus tipo 5 y el antígeno T grande de SV40 (que se localizan en el núcleo). Pueden extender la vida de células primarias, cooperar con oncoproteínas citoplasmáticas, tales como ras, para transformar completamente células primarias de rata, inducir la síntesis de DNA en células detenidas en crecimiento, transformar líneas establecidas de roedor y modular la transcripción de ciertos promotores (Ruley, 1990). Existen regiones de aminoácidos similares entre E7, E1A y el antígeno T grande de estos diferentes virus tumorales de DNA (Figge et al., 1988; Phelps et al., 1988; Dyson et al., 1989) y estas regiones conservadas han mostrado participar en la unión a importantes proteínas celulares, como pRB (DeCaprio et al., 1988; Ewen et al., 1989; Múnger et al., 1989b; Whyte et al., 1989). Así, las propiedades biológicas comparables de estas diferentes oncoproteínas pueden derivar de su capacidad para atacar a un conjunto similar de proteínas reguladoras celulares. El dominio amino terminal de las proteínas E7 está altamente conservado entre los HPVs de alto riesgo y de bajo riesgo (Howley, 1991).

E7 de los HPVs tipo 16 y 18 es necesario y suficiente para la inmortalización y transformación de cultivos primarios (Kanda et al., 1988; Crook et al., 1989) y la transformación de líneas

fibroblásticas de roedores (Vousden et al., 1988; Watanabe y Yoshiike, 1988; Bedell et al., 1989; Tanaka et al., 1989), así como para la inmortalización de queratinocitos humanos (Halbert et al., 1991), y puede cooperar con un oncogene ras activado para transformar células primarias de rata (Phelps et al., 1988; Storey et al., 1988; Bedell et al., 1989). Las líneas celulares que son producidas por transfecciones con HPV son tumorigénicas en ratones desnudos y contienen y expresan el genoma viral (Storey et al., 1988).

Las propiedades de las proteínas E6 codificadas por los papilomavirus del tracto genital han sido menos estudiadas que para las proteínas E7. E6 inmortaliza células primarias de rata, aunque el efecto es menor que el de E7 (Kanda et al., 1988) y puede transformar fibroblastos de ratón (Bedell et al., 1989; Sedman et al., 1991). Se ha detectado una proteína E6 de HPV-16 con peso de 18 kd en células CaSki y SiHa (Androphy et al., 1987) y otros autores han encontrado una de 16.5 kd en células HeLa (HPV-18) (Banks et al., 1987b), las cuales se aproximan al peso predicho a partir de la secuencia de DNA de 19 kd. En células CaSki se ha identificado una proteína E6 de 11 kd, probablemente generada por un evento de empalme (splicing) (Seedorf et al., 1987). La proteína E6 tiene gran afinidad por el DNA (Mallon et al., 1987) y se ha encontrado tanto en el núcleo como en la membrana plasmática. Se ha sugerido que las proteínas E6 del HPV-16 y del HPV-18 tienen propiedades de unión a una secuencia específica en la LCR (Imai et al., 1989) y de activación

transcripcional (Lamberti et al., 1990; Sedman et al., 1991). Existe evidencia que sugiere que E6 puede interactuar con ella misma o con otras proteínas celulares (Banks et al., 1987b). Al respecto, se ha observado que las proteínas E6 de HPVs de alto riesgo se asocian con la anti-oncoproteína p53, pero no así la proteína E6 de HPVs de bajo riesgo (Werness et al., 1990). Asimismo, recientemente se demostró que la oncoproteína E6 codificada por los HPVs de alto riesgo promueve la degradación (dependiente de ATP y que involucra el sistema de proteasa dependiente de ubiquitina) de p53; así que aunque las oncoproteínas de otros diferentes virus tumorales de DNA (antígeno T grande de SV40 y E1B de adenovirus tipo 5) se unen a p53, la consecuencia de la interacción proteína-proteína es probablemente muy diferente (Scheffner et al., 1990).

Por todo lo anterior, se observa que los papilomavirus de alto riesgo ejercen al menos algunos de sus efectos proliferativos y oncogénicos a través de las interacciones de las oncoproteínas E6 y E7 con proteínas celulares claves que tienen propiedades regulatorias. Las investigaciones futuras se enfocarán no sólo sobre el papel de E6 y E7 en la iniciación y el mantenimiento del estado transformado, sino también en el papel de los cambios genéticos y celulares que las acompañan (Schlegel, 1990; Howley, 1991).

El hecho de que E7 solo es suficiente para la transformación de ciertos tipos celulares mientras para otros son requeridos E6 y E7, sugiere que factores celulares específicos pueden ejercer

una influencia importante e ilustra la desventaja potencial de extrapolar demasiado cualquier sistema in vitro (Sousa et al., 1990).

Los elementos regulatorios de la expresión de los oncogenes virales E6 y E7 se encuentran localizados en la región de control LCR, donde están elementos como las cajas TATA y CAAT. En la actualidad se han caracterizado varios elementos del DNA, en la región de control de HPVs genitales de alto riesgo, que son el blanco de interacción de factores proteicos virales y celulares (García-Carrancá et al., 1988; Chong et al., 1991). La proteína codificada por el gen E2 es un factor que regula los promotores virales de los oncogenes E6 y E7, uniéndose al DNA en forma de dímero, y específicamente a una secuencia conocida (Thierry y Yaniv, 1987; Dostatni et al., 1988; García-Carrancá y Gariglio, 1993).

DETECCION DE ANTICUERPOS CONTRA PROTEINAS TEMPRANAS DE HPV-16

Para la detección de las infecciones por los HPVs se ha confiado casi exclusivamente en pruebas de hibridización de ácido nucleico, algunas de las cuales varían substancialmente en sensibilidad y especificidad. Por eso, no es tan sorprendente que análisis epidemiológicos de gran extensión, cuidadosamente controlados, no sean aún disponibles, aunque son claramente deseados (zur Hausen, 1989a).

Las infecciones por HPV-16 en mujeres asintomáticas parecen ser muy comunes, ya que dependiendo del método usado, hasta un 80% de las muestras de DNA extraídas de exudados cervicales han

hibridizado con DNA de este HPV (Lőrincz et al., 1986; de Villiers et al., 1987; Gergely et al., 1987; Tidy et al., 1989).

Pero en contraste a nuestra comprensión de la prevalencia de DNA viral, poco se conoce sobre la respuesta de anticuerpos inducida por los HPVs, en particular por los tipos de HPVs asociados con lesiones genitales, tal vez porque los antígenos virales para ensayos serológicos no pueden ser obtenidos de sistemas de cultivos de tejidos, y han llegado a ser disponibles sólo recientemente a través de las aplicaciones de la tecnología de DNA recombinante (Banks et al., 1987a; Seedorf et al., 1987; Tomita et al., 1987; Jochmus-Kudielka y Gissmann, 1990).

El trabajo de Jochmus-Kudielka y colaboradores (1989) representa un primer intento en seroepidemiología de respuesta de anticuerpos contra proteínas específicas codificadas por HPV-16. En correlación con estudios previos realizados con tipos definidos de viriones purificados y sueros de humanos y de ganado (Pfister y zur Hausen, 1978; Pfister et al., 1979), la respuesta total de anticuerpos contra antígenos de E4 y E7 de HPV-16 parece baja. E4 fue escogida por ser la proteína más prominente en verrugas de piel inducidas por HPV-1 (Croissant et al., 1985; Doorbar et al., 1986). Además, un mRNA específico de E4, altamente abundante, empalmado al extremo 5' del ORF E1 ha sido encontrado en verrugas genitales (Chow et al., 1986, 1987b) y en una línea celular de queratinocitos humanos inmortalizada por HPV-16 (Dürst et al., 1987b). A diferencia de E4, la proteína E7 está presente no sólo en lesiones benignas producidas por virus

sino también en células cancerosas (Smotkin y Wettstein, 1986; Chow et al., 1987a; Seedorf et al., 1987). También se sabe que la región E6-E7 posee propiedades transformantes (Bedell et al., 1987; Phelps et al., 1988; Crook et al., 1989). E4 y E7 han podido ser exitosamente expresadas en Escherichia coli como proteínas de fusión (Jochmus-Kudielka y Gissmann, 1990). La frecuencia de sueros positivos a anti-E4 fue así tres veces más alta (32.6%) en pacientes con lesiones genitales asociadas a HPV que en los controles (11.4%) (Jochmus-Kudielka et al., 1989); en sueros de pacientes con cáncer cervical, la respuesta a la proteína E7 (expresada uniformemente en células de carcinoma cervical positivo a HPV-16), es sorprendente: los anticuerpos contra la proteína E7 de HPV-16 se encontraron 14 veces más frecuentemente (20.5%) en pacientes con cáncer cervical comparados con los controles (1.4%) y en lesiones precancerosas sólo se encontraron en NIC III. Además, los títulos de anticuerpos en el grupo con cáncer excedieron regularmente a los de los controles. De lo anterior se concluyó que anticuerpos anti-E4 pueden estar correlacionados con la replicación del virus y que anticuerpos anti-E7 pueden representar un marcador para el desarrollo de cáncer cervical.

LAS PROTEINAS DE 110 Y 115 KD

Recientemente, se ha observado que linfoblastos provenientes de pacientes con el diagnóstico de LLA muestran alteraciones del producto proteínico del oncogene c-myc y de proteínas antigénicamente relacionadas (Miranda et al., 1988, 1991). En células linfoides provenientes de pacientes con LLA se observa la presencia de un doblete de aproximadamente 110 y 115 kd, además de una proteína de 60 kd, al utilizar un anticuerpo dirigido contra una región altamente conservada en c-Myc (aminoácidos 43 al 55), L-Myc, N-Myc y v-Myc. Este mismo patrón se observa en linfocitos de sangre periférica de individuos sanos estimulados a proliferar con interleucina 2 (IL-2) o con fitohemaglutinina (PHA), y en líneas celulares transformadas (HeLa y Raji), así como en otros casos de leucemias y síndromes sanguíneos de estirpe linfocítica (E. Miranda Peralta, comunicación personal). En linfocitos de sangre periférica provenientes de individuos sanos, se observa un patrón de bandas distinto: solamente la banda de 110 kd y una banda no detectada antes de 40 kd. Además, se observa la aparición de un patrón de proteínas semejante al de individuos sanos en pacientes que tienen remisión de la enfermedad, volviendo a tener un patrón anormal si presentan recaída. Estas alteraciones proteínicas están posiblemente relacionadas con el proceso leucémico, por lo que su modificación hacia un patrón normal debería estar relacionado con la regresión de la enfermedad. Los resultados sugieren que la expresión diferencial de las proteínas de 115 y 60 kd está relacionada con

los procesos de proliferación mientras que la expresión de las proteínas de 110 y 40 kd está relacionada con la expresión de un fenotipo normal. Se considera por lo tanto que las proteínas 115 y 60 kd podrían servir como marcadores de proliferación celular, la cual forma parte de algunos de los cambios que ocurren durante el proceso de carcinogénesis. El enfoque de este trabajo fue dirigido al doblete de 110 y 115 kd y particularmente a la proteína de 115 kd.

Por otro lado, el aislamiento de genes que codifiquen para proteínas específicas, partiendo de bibliotecas de DNA recombinante en lambda gt11, puede ser logrado en principio, usando anticuerpos para detectar el antígeno producido por recombinantes específicos. Dadas las características de la proteína de 115 kd, que podrían servir como un marcador de proliferación celular en general y por lo tanto del cáncer en particular, era de gran interés encontrar el gen que la codifica, para así conocer sus propiedades y las de su producto proteínico. Para lograr el objetivo, se utilizó el anticuerpo que la reconoce, en una biblioteca de cDNA (proveniente de células B leucémicas) en lambda gt11, en la que un gen clonado se expresa potencialmente como una proteína de fusión.

LA BIBLIOTECA DE cDNA EN LAMBDA gt11

Los genes pueden ser aislados con sondas de ácidos nucleicos o con anticuerpos.

El aislamiento de genes que codifiquen para proteínas, a partir de bibliotecas de DNA recombinante puede ser obtenido, en principio, usando anticuerpos para detectar el antígeno producido por recombinantes específicos (Young y Davis, 1983a,b).

Los componentes más importantes del escrutinio exitoso son la biblioteca recombinante de DNA y la sonda de anticuerpo.

Dos tipos de bibliotecas de DNA recombinante pueden ser usadas: bibliotecas de cDNA y bibliotecas genómicas de DNA. Para organismos que tienen un gran tamaño de genoma, tales como el hombre (casi 3×10^9 pb y aproximadamente 100 000 genes), las bibliotecas de cDNA son tamizadas preferentemente porque, en general, no es técnicamente posible buscar un número suficiente de recombinantes genómicos para encontrar el gene deseado. Además, las bibliotecas de cDNA pueden ser preferibles para cerner cuando un gene es abundantemente expresado. cDNAs cercanos a los completos proveen la mayoría de determinantes antigénicos y son preferibles para el inmunoescrutinio. Sin embargo, bibliotecas de expresión de cDNA en lambda gt11 sufren del hecho de que mRNAs no abundantes son representados muy raramente y frecuentemente codifican sólo una porción terminal 3' del gene. De cualquier manera, son útiles para poder clonar cualquier gene, independientemente de su nivel de expresión.

En esta tesis se utilizó el método que permite partir de una

biblioteca recombinante de cDNA, de la cual pueden ser aisladas eficientemente clonas individuales productoras del antígeno deseado (Huynh et al., 1985).

Para el estudio de la estructura genética eucariótica y su expresión se confía en la disponibilidad de genes clonados. En muchos casos, la estrategia para aislar un gene eucariótico particular ha sido primero obtener una copia del DNA proveniente del RNA mensajero codificado por ese gene (una clona de cDNA). La estrategia general es como sigue. Una biblioteca de cDNA que representa la población de mRNA es construida (con ayuda de una reverso transcriptasa de un retrovirus de ave) usando RNA poliadenilado extraído del tejido apropiado o célula tipo. La doble cadena de cDNA preparada (usando DNA polimerasa I), es ligada en el vector lambda gtl1 en su único sitio EcoRI. El uso de un vector lambda en vez de un vector plasmídico hace posible aprovechar la alta eficiencia y reproducibilidad del empaquetamiento in vitro del DNA de lambda como un método para introducir secuencias de DNA en Escherichia coli. La alta eficiencia de clonar cDNA en vectores lambda es útil cuando clonas de cDNA de mRNA raros, son buscadas o cuando el mRNA para preparar cDNA es limitado en cantidad.

El hecho de que lambda gtl1 sea designado como un vector de expresión implica que éste puede ser usado para producir un polipéptido (en la forma de una proteína de fusión con β -galactosidasa) codificado por un fragmento de DNA previamente clonado. La proteína híbrida es producida por la clona

recombinante de lambda gt11 que se encuentra como una lisógena de E. coli. Ya que la estabilidad de la proteína de fusión es frecuentemente incrementada en una hospedera deficiente en proteasas, una hospedera lon⁻ (ver más adelante) es también usada para facilitar el aislamiento de cantidades preparativas de la proteína de fusión de un lisógeno recombinante de lambda gt11 particular.

Al escoger al vector de expresión lambda gt11 (lac5 cI857 nin5 S100) y al procedimiento de escrutinio con anticuerpos, se ha puesto particular atención a problemas asociados con la producción de proteínas foráneas en E. coli. Además, el vector de expresión recombinante debe tener propiedades que permitan la construcción y el mantenimiento de bibliotecas de cDNA. Todas estas propiedades se encuentran en el vector de expresión fago lambda gt11. El primer problema es obtener un nivel adecuado de expresión de la secuencia del DNA extraño. Teniendo secuencias del DNA foráneo fusionadas a secuencias del gene β -galactosidasa se asegura que el primero será expresado eficientemente en E. coli. El segundo problema es el controlar la producción de proteínas codificadas por las secuencias foráneas de DNA. Esto es importante cuando la proteína extraña es tóxica a la célula hospedera y pudiera matar a esta última antes de que se produzca suficiente cantidad del antígeno. Este problema ha sido minimizado usando células hospederas que produzcan grandes cantidades del represor del operon lac (el producto del gene lacI) para evitar la expresión en lacZ de la proteína de fusión

durante las horas iniciales de la formación de la placa. Cuando el número de células infectadas que circundan la placa sea suficientemente grande, la expresión dirigida de lacZ es inducida inactivando el represor con isopropil β -D-thiogalactopiranosido (IPTG). De esta manera, cantidades detectables del antígeno foráneo pueden ser producidas, aun si el antígeno es tóxico a las células. El tercer problema asociado con la producción de proteínas foráneas en *E. coli* es su estabilidad. La posición escogida dentro del gen β -galactosidasa para la fusión con secuencias de DNA foráneo corresponde a una región cerca del carboxilo terminal de la proteína β -galactosidasa, lo cual parece ayudar en la estabilidad de la proteína de fusión. Esto es especialmente notable en células deficientes en proteasas lon. La proteasa lon es una de las varias proteasas responsables para la generalmente baja estabilidad de proteínas foráneas o dicho de otro modo, proteínas anormales en *E. coli*. Estas proteasas frecuentemente hacen difícil acumular cantidades detectables de un antígeno en células de tipo silvestre. Por esta razón, una hospedera mutante lon es usada para incrementar la estabilidad de estas proteínas de fusión en el procedimiento de escrutinio o tamizaje.

El sitio usado para la inserción de DNA foráneo es un único sitio de inserción EcoRI localizado dentro del gene lacZ, 53 pares de bases antes del codón de terminación de la traducción de la β -galactosidasa. Lambda gt11 puede aceptar hasta 7.2 kb de DNA de inserto. El fago vector produce un represor sensitivo a

temperatura (CI857), que es inactivo a 42 °C, y contiene una mutación ambar (S100) que provoca lisis defectuosa en hospederas que carecen el supresor ambar supF.

Como el sitio de inserción para DNA foráneo en lambda gtl1 está dentro del gene estructural para la β -galactosidasa, las secuencias foráneas de DNA en este vector tienen el potencial de ser expresadas como proteínas de fusión con la β -galactosidasa. En un experimento típico, de 10^4 a 10^5 recombinantes individuales son escudriñados en forma de placas de fago sobre un césped de bacterias *E. coli* deficientes en proteasas. Las proteínas liberadas por la lisis de células dentro de las placas son inmovilizadas en un filtro de nitrocelulosa colocado sobre el césped. Las proteínas unidas al filtro de nitrocelulosa son sondeadas con un anticuerpo específico al antígeno de interés y el enlace del anticuerpo es revelado en un segundo paso al incubar el filtro con proteína A de *Staphylococcus aureus* marcada radioactivamente con ^{125}I . El recombinante responsable de la expresión del antígeno de interés es aislado del resto de las unidades formadoras de placa (u.f.p.), al tomar la placa que corresponde con la señal en el filtro. La clona de cDNA de interés es así identificada dentro de la población de clones de cDNA al cerner la biblioteca con anticuerpos usados como sondas.

La hospedera *E. coli* Y1090, tiene tres características que son útiles para el escrutinio de bibliotecas de expresión lambda gtl1 con anticuerpos. i) La cepa bacteriana usada es deficiente en la proteasa lon, lo cual incrementa la estabilidad de la

proteína de fusión recombinante. En células lon⁻ las proteínas de fusión con β -galactosidasa frecuentemente se acumulan a niveles muy altos en comparación a células tipo silvestres. ii) La cepa bacteriana contiene el pMC9, un plásmido derivado de pBR322 que alberga el gene lacI, que codifica al represor lac. Esto permite la expresión regulada de proteínas de fusión con β -galactosidasa. La expresión de proteínas foráneas, algunas de las cuales pueden ser dañinas al crecimiento de la bacteria huésped, es reprimida durante el crecimiento inicial del fago, pero es expresada después de la inducción con IPTG. En presencia de la mutación lon y ausencia de plásmidos represores, los recombinantes lambda gtl1 típicamente forman placas más pequeñas. iii) La tercera característica de la hospedera *E. coli* es la presencia del supresor supF de tRNA. supF suprime la mutación S100 de lambda gtl1 y permite la formación de placas. Las placas son preferibles para inmunoescrutinio porque pueden proporcionar una mucho mejor proporción de señal/fondo que métodos de escrutinio con lisógenos.

Los anticuerpos son el otro componente importante del escrutinio y pueden ser usados como sondas para aislar directamente clonas recombinantes cuyas secuencias de DNA codifiquen para la proteína de interés, diferenciando de otras proteínas disponibles. El éxito del inmunoescrutinio depende de la calidad del anticuerpo. Anticuerpos que producen buenas señales en inmunoblots o "Westerns" usualmente trabajan bien en tamizajes de bibliotecas. Anticuerpos monoclonales y policlonales

han sido exitosamente usados. Antisueros policlonales tienen la ventaja que pueden reconocer epítopes múltiples de cualquier proteína dada. La habilidad para detectar una variedad de epítopes sobre una proteína es importante ya que insertos de cDNA frecuentemente no son completos y de aquí que sólo una porción del polipéptido será expresado. Ya que un epítope sencillo puede ser compartido por múltiples proteínas, clonas diferentes de las recombinantes deseadas pueden ser también detectadas. Por eso, la inmunodetección con antisueros policlonales o con varios anticuerpos monoclonales que reconocen diferentes determinantes sobre la misma proteína es recomendado.

JUSTIFICACION

Como se ha notado anteriormente el cáncer es un problema de primerísimo orden tanto a nivel mundial como en nuestro país, al ser una de las principales causas de defunción. En México el cáncer cérvico uterino es tradicionalmente el de más alta incidencia en la población. Las leucemias son el principal tipo de cáncer que ataca a la población infantil y adulta joven. Estos cánceres provocan que se acorten vidas prematuramente y que mucha gente no se integre a la vida económicamente productiva, sin tomar en cuenta también el enorme gasto del sector salud, por lo que se debe apoyar más la investigación de vanguardia. Debido a lo anterior, se hace primordial el estudio del cáncer a nivel molecular, como una opción más, para poder ofrecer así mejores alternativas terapéuticas y diagnósticos más tempranos, que permitan posiblemente eliminar en forma precoz, racional y definitiva al cáncer, antes de que se lleve a cabo el proceso de metástasis, ya que el principal problema de los tumores cancerosos es la detección tardía. Por otra parte el estudio del cáncer ha ayudado a comprender como se llevan a cabo diferentes procesos celulares que tienen como su origen el genoma, desde la integración de virus, el papel de los virus y de los oncogenes en el cáncer humano, los cuales han sido una herramienta para entender como la expresión genética es regulada, hasta la pérdida del control del ciclo celular en donde los papilomavirus han servido como modelo para entender estos mecanismos.

OBJETIVOS

Encontrar marcadores moleculares de lesiones precursoras de cáncer cérvico-uterino y en particular buscar la relación entre la presencia en sueros de anticuerpos contra las proteínas tempranas E4, E6 y E7 del HPV-16 y el grado de lesión cervical.

Caracterizar parcialmente en células HeLa el doblete de 110 y 115 kd reconocido por el anticuerpo anti-Myc y comparar este doblete con la familia de proteínas Myc.

A partir de una librería de expresión de cDNA (proveniente de linfocitos B de leucemia) en el bacteriófago lambda gt11, encontrar candidatas que potencialmente expresen la proteína de 115 kd, presente diferencialmente en células transformadas.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para lograr realizar los objetivos, se llevó a cabo la siguiente estrategia experimental:

Para la búsqueda de anticuerpos contra las proteínas víricas E4, E6 y E7 del HPV-16, se emplearon los genes de estas, clonados en dos series de plásmidos de donde fueron expresados como proteínas de fusión para obtener los antígenos. Esto ayudó a eliminar la posibilidad de que los anticuerpos reconocieran a una proteína de E. coli del mismo tamaño que el antígeno buscado o a un péptido generado por la unión de las dos proteínas que forman la recombinante. Las proteínas de fusión se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS y se transfirieron a papeles de nitrocelulosa. Los papeles se cortaron en tiras para probar cada suero de paciente con lesión genital asociada a HPV. Posteriormente, se incubó cada tira con inmunoglobulinas anti-IgA, -IgG e -IgM conjugadas a peroxidasa y/o con proteína A unida a ^{125}I . Finalmente se buscó la relación entre la presencia de anticuerpos y el grado de lesión.

Para las proteínas 110 y 115 kd, se utilizaron extractos celulares de la línea HeLa, la cual expresa el doblete proteico. Las células se trataron con cicloheximida para conocer la vida media del doblete o se separaron las fracciones nuclear y extranuclear mediante la técnica reportada por Varshavsky. Los extractos celulares se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS y se realizó "Western blot" con el anticuerpo que reconoce el doblete.

Con el objeto de encontrar candidatas con el gene que codifique para la proteina de 115 kd, se tamizó una biblioteca de expresión de cDNA en lambda gt11 con el anticuerpo que reconoce a esta proteina. El cDNA proviene de mRNA de linfocitos B de leucemia, que es un tipo celular en el que se expresa a la proteina p115.

MATERIALES Y METODOS

RECOLECCION DE SUEROS

Se obtuvieron muestras frescas de sueros provenientes de 39 mujeres, todas ellas pacientes de la Clínica de Displasias del Hospital General "La Perla", en Ciudad Nezahualcoyotl, Estado de México. 36 de los sueros ensayados fueron obtenidos de pacientes con lesiones asociadas a HPV: verruga genital (condiloma) o NIC en estadios I, II o III. Un suero más fue obtenido de una paciente con carcinoma epidermoide verrucoso de la vulva. Estos 37 sueros fueron tomados al azar, sin ninguna preferencia en especial. Los otros 2 sueros fueron de mujeres aparentemente normales. No se analizó la presencia de DNA de HPV en el tejido cervical de ninguna mujer. Los criterios para el diagnóstico fueron tomados en base a la reacción característica con ácido acético al 5% y a observaciones colposcópicas y citológicas. La edad de las pacientes variaba entre 23 y 75 años. Desafortunadamente, la edad de 2 pacientes y el grado preciso de lesión en 1 de éstas no pudieron ser obtenidos.

Todo lo anterior se llevó a cabo con la valiosa colaboración de la Dra. Rosario Velasco Santiago y del Dr. César Santiago Pineda.

PLASMIDOS CON LOS MARCOS DE LECTURA ABIERTA

E4, E6 Y E7 DEL HPV-16

Los dos tipos de plásmidos utilizados se ilustran en la Figura 3.

Los tres vectores de expresión pEX 12mer-HPV16 E4, pEX 10mer-

HPV16 E6 y pEX 8mer-HPV16 E7 con los ORFs para E4 (nucleótidos 3399-3617; la numeración está de acuerdo a Seedorf et al., 1985), E6 (nucleótidos 110-556) y E7 (nucleótidos 585-855) respectivamente del HPV-16, fueron construidos por Seedorf y col. (Seedorf et al., 1987). Contienen los ORF de E4, E6 o E7, unidos a los primeros 98 aminoácidos de la polimerasa del bacteriófago MS2. El vector original pPLc24, que permite la expresión de insertos fusionados a los primeros 98 aminoácidos de la polimerasa de MS2, bajo el control del promotor P_L de lambda (Remaut et al., 1981, 1983a,b), fue modificado por la introducción de un "polilinker" con los sitios de restricción para EcoRI, BamHI, SalI, PstI, BglII, XbaI y HindIII en los tres marcos de lectura con respecto al término de la polimerasa de MS2. La cepa de E. coli C600/537 fue transformada con el plásmido recombinante, el cual, además confiere resistencia a ampicilina. La bacteria tiene un gene represor cI del fago lambda, sensitivo a temperatura, en un plásmido multicopia que confiere resistencia a canamicina.

Los ORFs de E4 y E7 fueron cortados del correspondiente pEX con HindIII o con BamHI/HindIII, respectivamente (Seedorf et al., 1987), y reclonados en el vector pCO5, el cual expresa los primeros 13 aminoácidos de la proteína cII del bacteriófago lambda, como la porción N-terminal de la proteína de fusión (Androphy et al., 1985). Como con los vectores pEX, la expresión del gene quimérico es controlada por el promotor P_L de lambda, inducible a temperatura. Los vectores de expresión derivados de

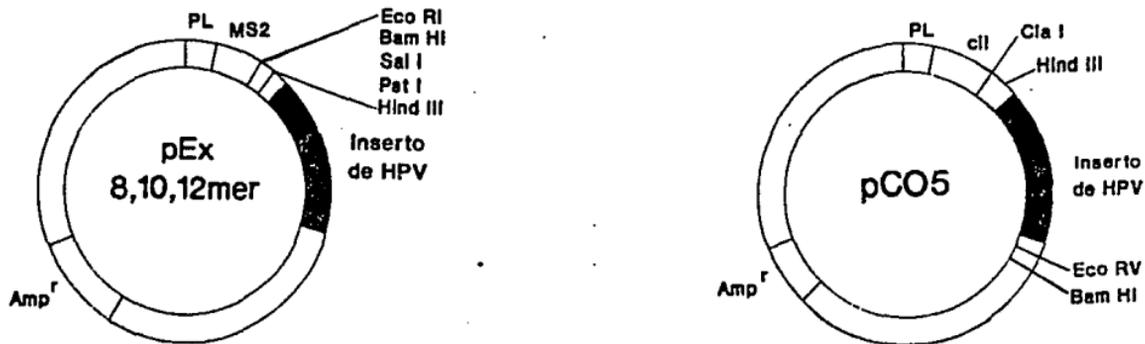


Figura 3. Plásmidos utilizados para la expresión de las proteínas E4, E6 y E7 del HPV-16 con los insertos de fusión MS2 y cII (L. Gissmann, comunicación personal).

pc05 fueron introducidos en *E. coli* cepa N6405, la cual contiene el gene de lambda cI857ts, un represor de P_L sensible a temperatura.

Las bacterias transformadas con los plásmidos fueron proporcionadas gentilmente por los Drs. Lutz Gissmann e Ingrid Jochmus.

MANTENIMIENTO DE BACTERIAS

El mantenimiento de las bacterias fue en superficies de medio Luria (LB) con agar, suplementado con ampicilina (Maniatis et al., 1982; ver anexo 1).

Las bacterias fueron resembradas a partir de una sola colonia en placas nuevas, procurando obtener colonias aisladas e incubando la nueva placa a 37 °C toda la noche. Finalmente, se almacenaron a 4 °C. El resembrado debe realizarse cada dos semanas.

OBTENCION DE LAS PROTEINAS DE FUSION CON E4, E6 Y E7 DEL HPV-16 EXPRESADAS EN BACTERIAS.

PROTEINAS DE FUSION DE LA SERIE MS2

El crecimiento de las bacterias y la inducción de la síntesis de sus proteínas de fusión, fueron realizados esencialmente como describen Remaut y col. (1981); la purificación de estas proteínas se realizó como reportan Jochmus-Kudielka y col. (1989).

Se creció la bacteria correspondiente (a partir de una colonia aislada) en 40 ml de medio líquido LB con ampicilina (LB-amp; ver anexo 1), a 37 °C en agitación durante toda la noche.

La bacteria crecida se agregó a 960 ml de medio LB-amp nuevo. El litro de cultivo se creció a 29 °C durante 45 min para alcanzar una $D.O.600 = 0.3$ (aproximadamente 2.5×10^8 células/ml). Después, se incubó por 3 hrs a 42 °C para lograr la inducción eficiente de la proteína de fusión. Se prosigió con la sedimentación del cultivo por centrifugación a 5 000 rpm durante 15 min (en este punto se puede guardar la pastilla a -20 °C). Posteriormente la pastilla se resuspendió en 8 ml de una solución con sacarosa al 8%, EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid o ácido etilendiamino tetra-acético o ácido edético) 50 mM y tris-HCl 50 mM (pH 8.0), agregándose finalmente 8 ml más de la misma solución suplementada con lisozima (Sigma), quedando ésta a concentración final de 0.2 mg/ml, y tritón X-100 (Bio-Rad) al 0.1% final, dejándose a t. a. por 30 min. Todo en frío de aquí en adelante. Se sonicó durante 30 seg (o más, si el lisado no es satisfactorio) a 60 V y se incubó por 15 min a 37 °C. El lisado fue centrifugado a 40 000 g (18 000 rpm para tubos de plástico de rotor JA20) por 15 min. La pastilla se resuspendió con 15 ml de PBS (ver anexo 1) que contenían tritón X-100 al 0.1 % y PMSF (Sigma; ver anexo 1) 0.2 mM. Se centrifugó nuevamente por 15 min a 40 000 g y la pastilla se resuspendió en urea 1 M con PMSF. Las proteínas de fusión fueron solubilizadas de la siguiente pastilla en 3 ml de urea 7 M con PMSF. Se centrifugó a 40 000 g durante 15 min por última vez, obteniéndose en el sobrenadante preparaciones altamente enriquecidas de la proteína de fusión (ver Figura 4). Se guardó en alícuotas a -20 °C.

PROTEINAS DE FUSION DE LA SERIE CII

Se sembraron cada una de las bacterias en 10 ml de medio LB-amp (ver anexo 1) y se dejaron crecer a 37 °C por toda la noche.

Este inóculo se añadió posteriormente a 300 ml de LB-amp y se incubó a 28 °C por 3 hrs. Para inducir las proteínas se pasó luego a incubar a 42 °C por 4 hrs. Las bacterias se sedimentaron del cultivo por centrifugación a 5 000 rpm por 15 min. Esta pastilla bacteriana se resuspendió en 5 ml de la siguiente solución A: tris 50 mM, EDTA 1 mM (pH 8.0) y se le agregó 5 ml de la misma solución conteniendo además lisozima a 0.2 mg/ml final. Se dejó reposar por 30 min en hielo con agitación periódica y se agregó 20 ml de la solución A que contenía también 0.1% de tritón X-100. Luego se sonicó tres veces a 12-15 micrones por 30 seg cada vez. Se centrifugó por 15 min a 40 000 g y la pastilla resultante se resuspendió en 30 ml de la solución A con 0.1% de tritón X-100. Por centrifugación a 40 000 g durante 15 min se obtuvo otra pastilla que se resuspendió en 2 ml de solución de urea 6 M-DTT (ver anexo 1) 10 mM. Finalmente, se centrifugó a las condiciones ya mencionadas, obteniéndose un sobrenadante enriquecido en las proteínas de fusión (ver Figura 4).

Como proteína control se usó el producto del gene v-Ha-ras unido a la proteína cII truncada, expresándose de la misma manera aquí mencionada.

Esta serie fue realizada por el IBQ Adolfo Pedroza Saavedra.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS

Se realizaron electroforesis en geles de poli(acrilamida)-SDS, de acuerdo al procedimiento descrito por Laemmli (1970).

Los geles separadores eran de 12 cm de altura por 14 cm de ancho y 0.2 cm de grosor. Fueron preparados al 10 o al 15% de acrilamida a partir de una solución de acrilamida-bis-acrilamida (ver anexo 1). Las concentraciones finales en el gel separador fueron las siguientes: 0.375 M de tris-HCl (pH 8.8) y 0.1% de SDS (sodium dodecyl sulfate o dodecil sulfato de sodio) que fueron tomados del RGB (ver anexo 1). Los geles fueron polimerizados químicamente por la adición de 0.037% (V/V) de TEMED (tetramethyl-ethylened amine o amina tetrametil-etilenada) y APS (ver anexo 1) al 0.1% por volumen.

Los geles concentradores eran 4.22% de acrilamida, tomada a partir de la solución de acrilamida-bis-acrilamida. Contienen además tris-HCl 0.108 M (pH 6.8) y SDS al 0.086%, tomados del SGB (ver anexo 1), y fueron polimerizados químicamente con 0.1% de TEMED y con 0.8%, por volumen, de APS. Se utilizó un peine para formar un solo pozo de aproximadamente 12 cm de largo (en el caso de las proteínas para probar los sueros de los pacientes), o se usaron otros para formar 10 ó 15 pozos (en los experimentos con células HeLa); el fondo del pozo quedó a una distancia de 1 cm del gel separador.

Las muestras (50-100 µg de proteína por carril en el caso de células HeLa; se normalizaron (HeLa) o se decidieron (proteínas

de fusión) las concentraciones con ayuda de un gel preparativo teñido con Coomassie) se mezclaron con 30 μ l de BM (ver anexo 1) por 100 μ l del extracto, quedando las concentraciones finales del BM a: 0.088 M de tris-HCl (pH 6.8), 2.56% de SDS, 6.36% de 2-mercaptoetanol (Bio-Rad) y 2% de la mezcla de bromofenol azul en glicerol. Las proteínas fueron completamente disociadas, colocando las muestras con BM por 3-5 min en agua hirviendo. Se cargó el gel con las muestras y se migraron del cátodo (-) al ánodo (+). Las electroforesis fueron realizadas con un voltaje de 75-90 V y a corriente constante en amortiguador de corrida (0.025 M de tris base, 0.192 M de glicina y 0.1% de SDS; ver anexo 1) hasta que el marcador de azul de bromofenol alcanzara el fondo del gel (en alrededor de 16-12 hrs, respectivamente).

TINCIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS CON AZUL DE COOMASSIE

El gel concentrador se desechó y el gel separador se tiñó por 1 hr con una solución de Coomassie, la cual contenía: 0.1% de azul brillante de Coomassie R-250, 45% de metanol y 9% de ácido acético. Posteriormente el gel fue primero desteñido por 1-2 hrs con la solución desteñidora I o de alto metanol: 45% de metanol y 7.5% de ácido acético (Weber et al., 1972); y después con la solución desteñidora II o de bajo metanol: 5% de metanol y 7.5% de ácido acético, dejando el gel desde 2 hrs hasta un día o más. (ver Figura 4). Finalmente, también se puede dejar el gel en metanol al 50%.

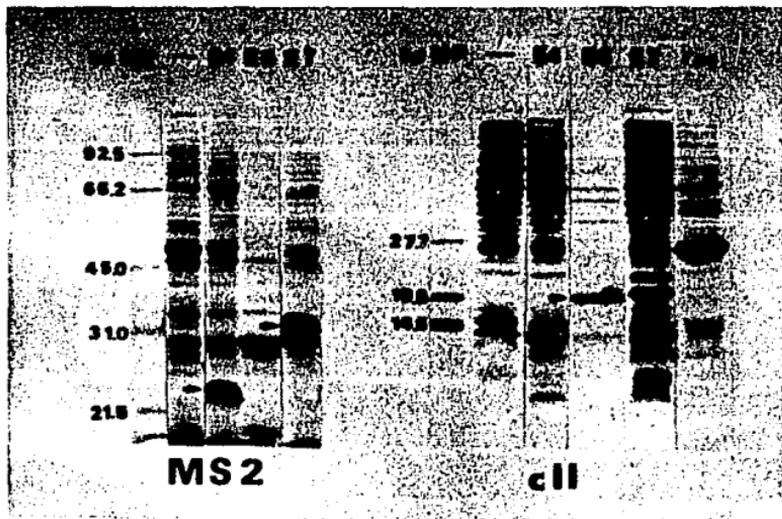


Figura 4. Gel de proteínas teñido con azul de Coomassie. Los extractos bacterianos enriquecidos con las proteínas de fusión de la serie MS2 o cII fueron cargados en geles de poliacrilamida-SDS al 10 o al 15% para cada serie respectivamente. Las flechas indican a las proteínas E4, E6 y E7 de cada serie. Los marcadores de peso (MP) se encuentran a la izquierda de cada serie con sus respectivos pesos dados en kilodaltones (kd). El primer extracto (-) corresponde a bacterias sin inducir, por lo que no se observa ninguna proteína de fusión.

ELECTROELUCION

La electroelución se realizó solamente para el caso de las proteínas de la serie cII (cIIE4 y cIIE7), con excepción de cIIE6, debido a la dificultad técnica que presentaba esta última. Con la electroelución se logró tener a las proteínas de interés muy purificadas y concentradas.

Primero se cortó la banda que correspondía a la proteína de fusión, de un gel preparativo de poliacrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie. Esta banda se cortó a su vez en trozos de aproximadamente 1.5 cm de largo y éstos se colocaron en una sola dirección dentro de una bolsa de diálisis de aproximadamente 5 cm de largo, agregándose 1 ml de amortiguador de corrida (ver anexo 1). Se colocó la bolsa en una cámara de electroforesis horizontal a un voltaje de 100 V durante aproximadamente 1 hr, de tal forma que las proteínas salieran del gel, del polo negativo al positivo. Finalmente se tomó el sobrenadante, conteniendo a la proteína de fusión correspondiente, y se corrió en un segundo gel de poliacrilamida-SDS con el que se realizaría la electrotransferencia a papel de nitrocelulosa.

ELECTROTRANSFERENCIA DE PROTEINAS DE GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS
A PAPEL DE NITROCELULOSA

Las proteínas fueron transferidas del gel de poliacrilamida al papel de nitrocelulosa de acuerdo a Towbin y col. (1979).

Se preparó el amortiguador de transferencia y se dejó una noche anterior a la electrotransferencia a 4 °C. El amortiguador contenía: 25 mM de trizma-base, 192 mM de glicina y 20% de metanol (ver anexo 1).

Al otro día, el gel fue equilibrado y lavado en el amortiguador anterior, durante 30 min antes de la electrotransferencia. Para formar el "sandwich", se colocó una hoja de esponja mojada sobre una rejilla de plástico (ambas son parte de la cámara de transferencia) y después un papel Whatman 3M, también mojado, de tamaño poco más grande que el gel. El gel se colocó sobre el papel Whatman procurando que conservara su forma original, es decir, que no sufriera deformaciones. Una hoja de nitrocelulosa de 15 X 13 cm (0.45 μ m de tamaño de poro, Schleicher & Schuell) fue mojada en el amortiguador de transferencia y colocada sobre el gel. Cuidadosamente, se sacaron todas las burbujas de aire entre el gel y el papel con ayuda de una pipeta usada como rodillo. Una segunda hoja mojada de papel Whatman 3M, de igual tamaño que la primera, fue colocada encima; posteriormente una segunda hoja de esponja mojada y finalmente la contraparte de la rejilla de plástico. La hoja de nitrocelulosa quedó así firmemente presionada contra el gel. El "sandwich" se colocó a presión en la cámara de electrotransferencia previamente

llenada con el amortiguador. El gel quedó en el lado del cátodo (-) y el papel de nitrocelulosa del lado del ánodo (+). La electrotransferencia se llevó a cabo a 4 °C, empezando con una corriente de 0.5 A y dejando que ésta llegara hasta 1 A, en alrededor de 2 hrs. Para evitar que aumentara la temperatura del amortiguador durante la transferencia, la cámara fue sumergida parcialmente en etanol con hielo seco.

TINCIÓN DE LAS PROTEÍNAS EN EL PAPEL DE NITROCELULOSA

Los marcadores de peso molecular, así como una parte con el espectro completo de las proteínas de fusión (0.5 cm), fueron teñidos en el papel de nitrocelulosa con negro amido (amido black, 0.1% en 5% de metanol/10% de ácido acético; Schaffner y Weissmann, 1973) durante 5 min. Para desteñir el papel se utilizó una mezcla de metanol al 5% y ácido acético al 10% durante 10 min. La tinción permite tener permanentemente a los marcadores de peso molecular y al espectro de las proteínas, asegurando que la electrotransferencia se realizó óptimamente.

PREABSORCIÓN DE LOS SUEROS

La mayoría de los sueros de humano contienen cantidades significativas de anticuerpos anti-*E. coli*, por lo que es necesario absorberlos antes de probarlos. Con esto se eliminó la mayor parte del fondo (ver Figura 5). Para esto, se usó la técnica seguida por la Dra. Ingrid Jochmus (comunicación personal).

Primeramente se realizó la inducción de la síntesis de las proteínas MS2 o CII-ras en la bacteria *E. coli* cepa C600/537 (con

el plásmido pEX 12mer sin el inserto de HPV), o en la cepa N6405 (con el plásmido pCO-Ha-ras) respectivamente, de la misma manera como se describió en la obtención de las proteínas de fusión (ver arriba). Las bacterias se centrifugaron a 6 000 rpm y la pastilla se lavó con 50 ml de TBS (ver anexo 1). Se centrifugó de la misma manera y se resuspendió ahora en 30 ml de TBS. Se sonificó 3 veces por un minuto cada vez y los lisados se guardaron en alícuotas a -20 °C.

Antes de poner cada suero a incubar con las tiras de nitrocelulosa, 50 μ l se mezclaron con 100 μ l del lisado correspondiente y 500 μ l de TBS en un tubo Eppendorf, dejándose por una hora a 37 °C en agitación suave. Se centrifugó por 2 min. Se tomó el sobrenadante y se agregaron 500 μ l de TBS con 10% de leche descremada (Sveltex de Nestlé) para incubar con las tiras.

WESTERN BLOT

Para las proteínas de fusión se utilizó básicamente la técnica seguida por I. Jochmus (Jochmus-Kudielka et al., 1989 y comunicación personal).

Las hojas de nitrocelulosa fueron cortadas en tiras de aproximadamente 2-4 mm (cada tira contenía el espectro de las respectivas proteínas obtenidas). Las tiras fueron bloqueadas por incubación con leche descremada en polvo (Sveltex de Nestlé) al 10% en TES (ver anexo 1) por 5 hrs. Los sueros preabsorbidos (dilución 1:20; ver arriba) se dejaron reaccionar con las tiras toda la noche a 4 °C. En cada prueba un suero humano no preabsorbido fue incluido como control, para probar la capacidad

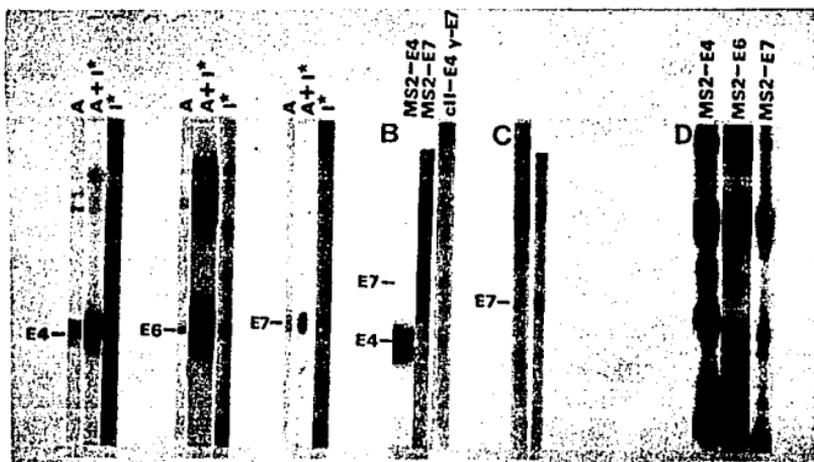


Figura 5. Detección de anticuerpos, en sueros de las pacientes, contra las proteínas tempranas E4, E6 y E7 de HPV-16 por la técnica de "Western blot". Cada tira conteniendo la proteína viral fue primero incubada con un suero y en un segundo paso: (A) la serie MS2 se incubó con anti-inmunoglobulinas humanas conjugada a peroxidasa; (A + I*) posteriormente estas mismas tiras fueron incubada con proteína A unida a ^{125}I ; y (I*) en el caso de la serie cII las reacciones fueron solamente con proteína A- ^{125}I . (B) Suero que incubado con ^{125}I reaccionó al mismo tiempo contra las proteínas E4 y E7 de ambas series. (C) Prueba de que mayor astringencia en los lavados da una señal más clara. (D) Sueros sin haberse preabsorbido antes de la incubación muestran un reconocimiento muy alto para proteínas bacterianas.

absorbente del lisado (ver Figura 5).

Al otro día los filtros se lavaron cinco veces con tween 20 (polioxietilen esorbitan monolaurato) al 0.1% en TBS, 10 min cada vez. Sólo las tiras de la serie MS2 fueron posteriormente incubadas durante 2 hrs con inmunoglobulinas anti-humanas (anti-IgA, anti-IgG y anti-IgM humanas, Cappel), provenientes de chivo y conjugadas con peroxidasa, diluidas 1:2 000 en TBS con 10% de leche descremada en polvo. Después, las tiras se lavaron cinco veces con tween 20 al 0.1% en TBS, 10 min cada vez. Se lavaron 2 veces más con tween 20 al 0.05% en TBS. Las tiras se revelaron de la siguiente manera: se disolvió 4-Cl-1-naftol a 3 mg/ml de metanol; esta solución se diluyó en 5 volúmenes más de PBS. Al momento de revelar se agregó 0.33 μ l de H₂O₂ al 30% por cada ml de la mezcla. El resultado se muestra en la Figura 5.

Se utilizó también proteína A de Staphylococcus aureus unida a ¹²⁵I (ver "Marcaje de la proteína A con ¹²⁵I") para la serie MS2 y CII (en el caso de la serie CII, fue la única reacción para revelar los anticuerpos de los sueros unidos a las proteínas virales, aprovechando la característica de la proteína A a unirse a IgGs humanas) incubando 150 000 cpm en 1 ml de WB 1X (tris 0.01 M pH 7.4, NaCl 0.15 M, tritón X-100 0.5% y SDS al 0.2%; ver anexo 1) durante 2 hrs y lavando como se indica al final de este apartado. El papel ya seco se colocó, envuelto en una bolsa de plástico, en un "cassette" (X-Omatic, Kodak) provisto de pantallas amplificadoras de radiación y se expuso una película Kodak de rayos X (X-Omat), guardándose todo a -70 °C. Finalmente,

se reveló la placa durante 1 min y se fijó durante 3 min, para poder ser observadas en la autorradiografía las proteínas reconocidas por los anticuerpos anti-E4, anti-E6 y anti-E7 de HPV-16 en los sueros de las pacientes (Figura 5).

Para el caso de las proteínas de los extractos celulares crudos de HeLa, el papel de nitrocelulosa fue primero bloqueado toda la noche con albúmina sérica bovina al 3% en WB 0.5X. Al otro día se puso el anticuerpo monoclonal anti-Myc 43-55 (ver más adelante), diluido 1:500 en WB 1X con albumina al 1%, durante 3 hrs. Se lavó 3 veces durante 10 min cada vez con WB 1X. Posteriormente se colocó la proteína A yodada a 1 500 000 cpm en 10 ml de WB 1X con albumina al 1% durante 2 hrs. Finalmente se lavó el papel 4 veces, 10 min cada vez, con WB 1X y 2 veces con WB 2X durante 10 y 20 min respectivamente. (Figuras 6 y 7).

MARCAJE DE LA PROTEINA A CON ^{125}I

Con una pipeta desechable de 5 ml se montó una columna de Sephadex G-10 (Pharmacia), el cual fue previamente hidratado en TEA-HCl 50 mM (trietanolamina hidróclorida, pH 8.0, Sigma). La columna se lavó repetidamente con amortiguador fresco y se cerró el flujo hasta su uso.

En el fondo de un tubo de Soda Lime (Thomas Scientific) se colocaron 20 μl de una solución de Iodo-gen (1,3,4,6-tetracloro-3a,6a-difenilglicuril) a una concentración de 1.8 mg/ml en cloroformo. La solución se secó y se distribuyó homogéneamente en el fondo del tubo con ayuda de N_2 . En otro tubo de 100 X 11 mm se realizó la mezcla de reacción, añadiéndose en el siguiente orden:

primeramente TEA-HCl, después una solución de HCl 0.1 N, luego el ^{125}I en NaOH (Amersham) y finalmente 10 μl de proteína A (de la solución de 5 mg/ml, Sigma) de Staphylococcus aureus. El ^{125}I (1 mCi fue lo mejor) debe diluirse en un volumen igual del HCl 0.1 N. El volumen final de la mezcla de reacción debe ser de 300 μl , los cuales se completan con TEA-HCl. Esta mezcla fue cambiada inmediatamente al tubo de Soda Lime con el Iodogen, manteniéndola en hielo durante 15 min con agitación manual cada 5 y cubierta con parafilm. La reacción se detuvo regresando la mezcla al tubo de 100 X 11 mm, al cual se le adicionó esta vez previamente 5 μl de 2-mercaptoetanol, agitándola. Ya detenida la reacción, la mezcla se pasó a la columna. Se permitió que terminara de entrar e inmediatamente se eluyó con TEA-HCl. Se colectaron 10 fracciones de 500 μl cada una con un colector de fracciones automático. De cada fracción se tomaron 2 μl y se cuantificó la radioactividad en un contador gamma, obteniéndose las cpm por μl de cada fracción y determinando así las fracciones correspondientes a la proteína A marcada (generalmente fracciones 4-5) y a la radioactividad libre. Las fracciones conteniendo la proteína A marcada se guardaron a 4 °C. El resto de las fracciones, así como la columna y los tubos utilizados durante el marcaje, se tiraron como desechos radioactivos. El marcaje radioactivo se realizó dentro de una campana de extracción, utilizando como protección guantes dobles de plástico, mandil recubierto con plomo y cubre bocas y se monitoreó la radioactividad todo el tiempo con un contador Geiger.

LINEA CELULAR HeLa

Se empleó la línea celular HeLa (establecida a partir de células de un tumor cérvico-uterino), que se cultivó en monocapa en medio Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium o D-MEM, Gibco, adicionando además 0.37% de NaHCO_3 y 0.624% de HEPES, pH 7.4 con CO_2 y filtrado en $0.22 \mu\text{m}$) suplementado con penicilina (200 U/ml), estreptomicina (0.2 mg/ml) (ver anexo 1) y 10% de suero no fetal (SNF) de bovino.

Cuando las células llegaron a confluencia en la caja de cultivo, se lavó la monocapa con PBS (ver anexo 1), se agregaron 4 ml de una solución con tripsina (tripsina disódica al 0.05%, NaCl al 0.8%, KCl al 0.04%, dextrosa al 0.1%, NaHCO_3 al 0.058%, EDTA al 0.02%, se filtró en $0.22 \mu\text{m}$) y se dejó reposar durante aproximadamente 3 min. Cuando las células se despegaron, se transfirieron a un tubo Falcon conteniendo 1 ml de SNF. Se centrifugó a 3 000 rpm durante 3 min. La pastilla se resuspendió en el medio de cultivo. Se sembraron 1.5×10^6 células en una caja p100 con 10 ml de D-MEM con SNF o 0.5×10^6 células en cajas p60 con 6 ml de D-MEM y SNF. Si se dejan por más de 5 días se cambia el medio. Si es necesario se agrega fungizona. Todo lo anterior se realizó en campana de flujo laminar. La caja sembrada se mantuvo en la incubadora a 37°C con 5% de CO_2 y presión de entrada de 1.5-2 psi hasta que la capa alcanzó la confluencia, momento en el cual pueden ser utilizadas para los experimentos o para continuar con los pasajes de mantenimiento.

Se contó con la ayuda de la técnico Consuelo Rodríguez.

INHIBICION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS CON CICLOHEXIMIDA

La cicloheximida inhibe la síntesis proteica en los ribosomas 80S de los eucariontes.

8 cajas p60 con células HeLa casi a confluencia se dejaron una noche sin suero y al otro día a las cajas a 100% de confluencia se les cambió el medio y se les agregó 15% SNF durante 1.5 hrs. Posteriormente, se puso la cicloheximida (de la solución de 10 mg/ml) a una concentración final de 150 µg/ml y se tomaron tiempos de 0 (sin cicloheximida), 5, 10, 15 y 20 minutos para cada caja. A estos tiempos la caja respectiva se lavó y las células se rasparon en 1 ml de amortiguador "B" (tris-HCl 25 mM pH 7.9, EDTA 2 mM + 10% de glicerol, y al momento de ser utilizado DTT 1 mM y PMSF 0.2 mM; ver anexo 1) con ayuda de un pequeño pedazo de hule o gendarme (1 X 1 X 0.2 cm aproximadamente) repartiéndose en alícuotas de 100 µl (1 000 000 de células aproximadamente). Estas se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -20 °C hasta el momento de cargarlas en el gel de poliacrilamida-SDS. (Figura 6).

Todo se realizó con la valiosa colaboración de la P. de Ing. Amb. Luz María Rangel Ramírez.

OBTENCION DE NUCLEOS DE CELULAS HeLa

El método empleado para la extracción de núcleos fue el descrito por Varshavsky y col. (1978). Éste fue realizado por el M. en C. Efraín Garrido Guerrero.

Se retiró el medio de las cajas de células casi a confluencia, se lavaron dos veces con 2.5 ml del amortiguador 1 (tris-HCl 1 mM pH 6.8, NaCl 140 mM) y posteriormente se añadió a cada caja 2.0 ml del amortiguador 2 (TEA-HCl 10 mM pH 6.8, tritón X-100 0.25%, EDTA-Na 10 mM, PMSF 1 mM) adicionando NaCl a una concentración final de 120 mM, e incubando las cajas durante 10 min a 4 °C sobre hielo en posición perfectamente horizontal. El lisado obtenido se raspó de las cajas con ayuda del gendarme, se vació a un tubo y se centrifugó durante 5 min a 6 500 rpm en un rotor Sorvall SS34 a 4 °C. La pastilla obtenida se resuspendió en el volumen adecuado de amortiguador 3 (TEA-HCl 10 mM pH 6.8, tritón X-100 0.25%, NaCl 120 mM, EDTA 10 mM, PMSF 0.1 mM) en una proporción de 2.0 ml por cada caja p100 o por cada 1×10^6 células y se centrifugó nuevamente por 5 min a las mismas condiciones que la centrifugación anterior, quedando en el sobrenadante el material extranuclear de las células (Figura 7). La pastilla se resuspendió añadiendo gota a gota 100 μ l del amortiguador 4 (TEA-HCl 10 mM pH 8.0, tritón X-100 0.25%, NaCl 120 mM, EDTA 10 mM, PMSF 0.1 mM) por cada caja de células, golpeando ligeramente el tubo para homogenizar, obteniéndose de esta manera el material nuclear (Figura 7). Las alícuotas se guardaron a -20 °C, hasta el momento de cargarse en el gel.

PREABSORCION DEL ANTICUERPO

El anticuerpo monoclonal anti-Myc 43-55 (Microbiological Associates) aquí utilizado, está dirigido contra una secuencia peptídica sintética de c-Myc (aviar, murino y humano): la región 43-55 (Ala-Pro-Ser-Glu-Asp-Ile-Trp-Lys-Lys-Phe-Glu-Leu-[Cys]), la cual también se presenta en N-Myc (humano), L-Myc (humano) y v-Myc, o sea, es una región altamente conservada en la familia de proteínas Myc.

Contaminaciones con anticuerpos anti-E. coli pueden ser removidas mediante "pseudotamizaje" de proteínas liberadas por la lisis de bacterias E. coli infectadas con fagos silvestres (R. Hernández Rivas, comunicación personal) (Figura 8).

La bacteria E. coli Y 1090 fue crecida en 50 ml de LB-amp con 0.2% de maltosa, toda la noche a 37 °C. Al otro día, el cultivo se centrifugó en un tubo nuevo y se decantó el medio, dejando la pastilla bacteriana en el fondo. El anticuerpo ([1mg/ml], dilución 1:1 000 en WB 1X con albumina al 1%; ver más abajo) se agregó con cuidado y se puso en agitación suave a 4 °C durante alrededor de 12 hrs.

200 μ l de E. coli Y 1090 (tomados del cultivo anterior) infectados con 100 μ l de fagos lambda gt11 (sin insertos) fueron plaqueados (7×10^4 u.f.p. por caja; ver más adelante) y filtros cubiertos por ambos lados con proteínas propias de la lisis, preparados de acuerdo a las condiciones del tamizaje descritas más adelante, fueron incubados con el mismo anticuerpo diluido, a 4 °C toda la noche.

TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA DE EXPRESION DE cDNA EN LAMBDA gt11

En la biblioteca de cDNA (Clontech Laboratories) aquí utilizada, la fuente de mRNA proviene de células B de una leucemia humana, RPM 4265 (Turner et al., 1975).

Para el tamizaje se siguió básicamente el protocolo descrito por Huynh y col. (1985), con algunas modificaciones.

Una colonia de la bacteria E. coli Y 1090 se creció en medio líquido LB-amp suplementado con maltosa al 0.2% (ver anexo 1), a 37 °C toda la noche en agitación.

Al otro día, se mezclaron 200 μ l del cultivo con 100 μ l de una dilución de fagos que contenían alrededor de 5 000 u.f.p. Se permitió la absorción del fago a las bacterias a 37 °C durante 20 min. Se agregaron 2.5 ml de top agarosa (ver anexo 1); se revolvió bien y rápidamente se vació uniformemente en una superficie de medio LB con agar (ver anexo 1) precalentada a 37 °C. Se permitió que la mezcla solidificara perfectamente y la caja se incubó a 42 °C durante 4 hrs. Pasado este tiempo, sin permitir que se enfriara de más, se cambió la caja a 37 °C. Se colocó sobre el medio un disco de nitrocelulosa de un tamaño de poro de 0.45 μ m y diámetro ligeramente menor que el de la caja, previamente saturado con IPTG (Sigma; ver anexo 1) 10 mM, incubándose durante 3 hrs. Un segundo disco como duplicado se colocó después de que el primero se quitó y se incubó por 3 hrs más. Antes de quitarlos, se realizaron agujeros asimétricos (con ayuda de una aguja) que coincidieran en las orillas de ambos discos, para posteriormente, poder hacer coincidir estos últimos

exactamente y conocer así la ubicación precisa de las u.f.p. positivas en los dos discos. No se debe permitir que los discos se sequen de aquí en adelante en ningún momento. Cada disco, después de ser removido, se colocó a bloquear con albúmina sérica bovina al 3% en WB 0.5X toda la noche.

Al otro día, se cambió esta solución por la del anticuerpo anti-Myc 43-55, previamente absorbido toda la noche como se indicó anteriormente (dilución 1:1 000 en albúmina al 1% en WB 1X), durante 3 hrs. Después se lavaron los discos con WB 1X 3 veces durante 10 min cada vez. Los discos se incubaron con la proteína A unida a ^{125}I (450 000 cpm) en WB 1X con albúmina al 1% durante 2 hrs. Se lavaron los discos con WB 1X 4 veces durante 10 min cada vez y con WB 2X dos veces durante 10 y 20 min respectivamente. Los discos se pusieron a secar y se envolvieron en bolsas de plástico, para finalmente colocarse en un "cassette" con pantallas amplificadoras de radiación, en presencia de una película Kodak de rayos X (X-Omat) y guardarse a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Todo el procedimiento se realizó al mismo tiempo con varias cajas, para abarcar un gran número de recombinantes del banco de cDNA y tener así una mayor oportunidad de obtener varias candidatas.

Al tiempo conveniente, la película se reveló (1 min) y fijó (3 min). Las señales dejadas en las películas por cada disco fueron comparadas con su respectivo duplicado, basándose en los agujeros asimétricos hechos en ellos y que se observaban en la placa, haciendo de este modo coincidir ambos discos exactamente (Figura 9).

Sólo se tomaron en cuenta las señales en la película que coincidieran en ambos discos (Figura 9), logrando así, por una parte, confirmar la señal positiva y, por otra parte, eliminar posibles falsos positivos e inespecificidades del ^{125}I . Se tomaron las u.f.p. del medio (cuyas señales coincidieron en las películas de ambos discos), con una pipeta Pasteur, procurando tomar sólo la placa positiva. Cada u.f.p. positiva se depositó en un tubo conteniendo medio SM (NaCl 0.1 M, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2% o 0.1% (W/V) si es ahnidrido, tris Cl 1 M pH 7.5 5%, gelatina 0.01%; ver anexo 1), el cual es especial para almacenamiento de fagos, y se guardaron a 4 °C.

Todas las clonas positivas fueron probadas con la misma técnica 1 vez más, tomándose otra vez sólo u.f.p. positivas que sí se repetían en ambos discos y eliminando las que no se repetían, logrando así tener candidatas más seguras.

PRUEBAS DE ESPECIFICIDAD EN EL RECONOCIMIENTO DE CANDIDATAS DEL TAMIZAJE

Con las candidatas obtenidas en el doble tamizaje, por un lado, se deseaba descartar un posible reconocimiento de la proteína expresada por estas, por parte de la proteína A marcada con ^{125}I . Por otro lado, se quería tener mayor seguridad en que el reconocimiento de nuestro anticuerpo fuera específico.

Se utilizaron 6 candidatas tomadas al azar para realizar tamizajes de acuerdo al protocolo que se describió anteriormente, con la variante de que los discos no se incubaron con ningún anticuerpo (Figura 10, panel A).

En otro tamizaje, se tomó 1 de las candidatas (al azar) y se siguió el protocolo normal, pero en vez de incubar el disco con el anticuerpo monoclonal anti-Myc 43-55, se utilizó un anticuerpo policlonal (Cambridge Research Biochemicals) anti-Myc contra la misma región peptídica (Figura 10, panel B), el cual, reconoce la proteína p62^{C-MYC} que se tiene previamente reportada (Ramsay et al., 1984), pero no el doblete proteínico de 110 y 115 kd (datos no mostrados).

AMPLIFICACION Y TITULACION DE LAS CANDIDATAS

Cada candidata reconocida por el anticuerpo anti-Myc 43-55 necesitaba ser amplificada (para tener un número alto de fagos) y titulada (para conocer el número obtenido de fagos).

Para la amplificación, se tomaron 200 μ l de la candidata respectiva y se mezclaron con 400 μ l de la bacteria *E. coli* Y 1088 (previamente crecida toda la noche a 37 °C en LB-amp con maltosa 0.2%; ver anexo 1), para entonces permitir la absorción del fago por la bacteria a 37 °C durante 20 min. Se agregaron 2.5 ml de top agar (ver anexo 1) y después de mezclar, se vaciaron sobre una caja de medio LB con agar (ver anexo 1), precalentada a 37 °C, de manera que se distribuyeran homogéneamente sobre la superficie. Se dejó a 37 °C toda la noche.

Al otro día se agregaron 1.5 ml de SM (ver anexo 1) a la caja y se dejó reposar en una superficie horizontal, para procurar que el SM cubriera perfectamente toda la superficie. Pasados 30 min, se raspó la superficie del top agar con una varilla de vidrio con un extremo en forma de triángulo, previamente flameado. Se trató

de limpiar la superficie lo más posible de medio SM, acumulándolo en una orilla de la caja para ser tomado con ayuda de una micropipeta. Se depositó el medio en un tubo de ensaye y éste se centrifugó a 2 500 rpm durante 5 min, para sedimentar así los restos bacterianos y el agar. El sobrenadante se pasó a un tubo de ensaye etiquetado con el nombre de la candidata respectiva. Finalmente, se agregó una gota de cloroformo para evitar contaminación bacteriana y se guardó a 4 °C.

Para la titulación se tomaron 10 μ l de la candidata amplificada y se realizaron 4 diluciones consecutivas de 1:100 cada una, en medio SM. Se tomaron 100 μ l de cada dilucion y se mezcló cada una con 200 μ l de la bacteria E. coli Y 1088 crecida previamente (como se indicó anteriormente). Se plaqueó cada dilución con top agar de la manera antes descrita y se dejó toda la noche a 37 °C.

Al otro día se contaron las u.f.p. de cada caja, para de esta manera saber si la correlación entre las 4 cajas es correcta. El número de placas se extrapoló a la mezcla concentrada y así se determinó el número de u.f.p. que tenemos por mililitro en esta.

Si es deseado, se puede realizar una quinta dilución.

EXPRESION DE PROTEINAS EN FAGOS LAMBDA qt11

PARA ELECTROFORESIS

Se creció la bacteria CAG 456 (λ on⁻) en LB con maltosa al 0.2% (ver anexo 1), a 30 °C toda la noche.

Se tomó 1 ml del cultivo y se agregó a 20 ml de LB nuevo, creciéndose a 30 °C hasta una D.O.₅₆₀ = 0.4 (alrededor de 1 hr 10 min). Se mezclaron 15-20 fagos por bacteria (2.5×10^8 bacterias/ml de cultivo) con 2 ml del cultivo. Se absorbió el fago a la bacteria por 20 min a t. a. Se puso todo 4 hrs a 37 °C en agitación (con y sin IPTG 10 mM). Se empastilló 30 seg en Eppendorf. Se resuspendió en 100 μ l de BM (ver anexo 1) por cada ml del cultivo y se puso en agua hirviendo de 3-5 min. Se cargó en el gel de poliacrilamida-SDS.

Con este gel se realizó la electroforesis y posteriormente la electrotransferencia a papel de nitrocelulosa y el "Western blot", como se explicó previamente.

Nota: en materiales y métodos, cuando no es especificada la temperatura, se asume que es temperatura ambiente.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

RESULTADOS

DISTRIBUCION DE EDADES DE LAS PACIENTES

Treinta y cinco, de las 37 pacientes, presentaron edades desde los 23 hasta los 75 años, distribuidas de la siguiente manera:

Edad	No. de pacientes	% respectivo
21-30	10	28.6
31-40	16	45.7
41-50	8	22.9
>50	1	2.9

La edad promedio de las 35 mujeres fue de 36.0 años.

La edad de las otras 2 pacientes no pudo ser determinada.

Estos porcentajes son muy similares a los de las pacientes atendidas en la Clínica de Displasias del Hospital General "La Perla" en Ciudad Nezahualcoyotl (R. Velasco Santiago, comunicación personal), por lo que nuestra muestra podría considerarse representativa del lugar en cuanto a la distribución de edades.

DISTRIBUCION DE LESIONES DE LAS PACIENTES

Los porcentajes de distribución de NICs son sólo parcialmente semejantes entre el lugar de recolección (R. Velasco Santiago, comunicación personal) y nuestra muestra.

Lesión	No. de pacientes	% con respecto al total de NICs
NIC I	14	51.9
NIC II	6	22.2
NIC III	7	25.9

Además, se tomaron 8 sueros de pacientes con diagnóstico de condiloma cervical. Estos corresponderían a un 21.6% del total de los 37 sueros recolectados.

Una paciente más (la única mayor de 50 años) presentó carcinoma epidermoide verrucoso de la vulva.

Desafortunadamente, a 1 de las 37 pacientes no se le pudo determinar exactamente su grado de lesión.

Es interesante hacer notar que varios de los casos de NICs (25.9%) se encontraban asociados con condilomas: 14.3% de NIC I, 50% de NIC II y 28.6% de NIC III.

PRUEBA PARA COMPROBAR LA ESPECIFICIDAD DE LA REACCION DE LOS ANTICUERPOS A LAS PROTEINAS E4, E6 Y E7 DEL HPV-16

En el ensayo de "Western blot", los anticuerpos de los sueros podrían haber mostrado una reacción cruzada con alguna proteína de *E. coli* o con un péptido generado por la unión entre las proteínas virales y procarióticas, en ambos casos del mismo peso que las proteínas virales buscadas, dando así falsos positivos. Para poder discriminar a estos últimos, las proteínas E4, E6 y E7 fueron expresadas con dos diferentes porciones de fusión N-terminales: la polimerasa del bacteriófago MS2 y la proteína CII del bacteriófago lambda. Solamente se tomaron como positivos los sueros que reaccionaron con las señales más fuertes y claras a ambas proteínas de fusión en los ensayos con ^{125}I , por ser éste el método más sensible (Figura 5). Las señales que eran dudosas a una o a las dos proteínas de fusión no se tomaron en cuenta. Por lo tanto, los resultados son conservadores, para asegurar así su

veracidad. Sin embargo, hay muchas reacciones dudosas que podrían resultar falsas negativas, las cuales incrementarían los resultados (en algunos casos incluso hasta el doble).

El porcentaje de reacciones que coincidieron (positiva o negativamente) con las dos proteínas de fusión fueron 52.9% para E4, 62.6% para E6 y 48.6% para E7. Estos relativamente bajos porcentajes se debieron en buena parte al hecho de tomar sólo las señales más claras y fuertes de cada ensayo.

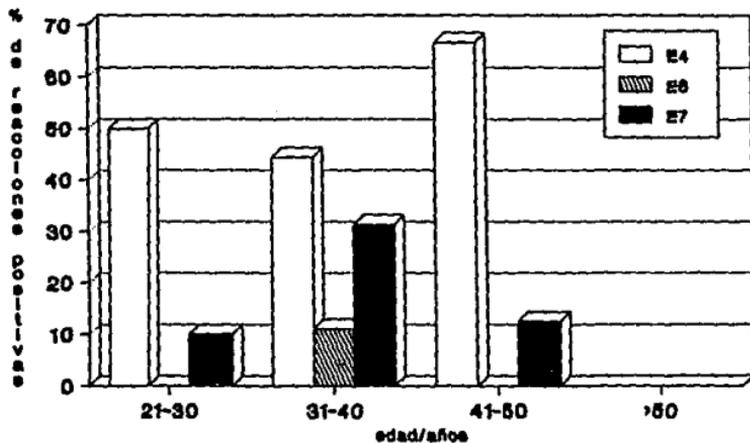
ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEINAS E4, E6 Y E7 DEL HPV-16 EN LOS SUEROS DE LAS PACIENTES

Para las proteínas de fusión con E4 y E6 se probaron 17 sueros. Para la proteínas de fusión con E7 se probaron todos los 37 sueros. Como controles se usaron 2 sueros de mujeres sin lesiones genitales aparentes debidas a HPV.

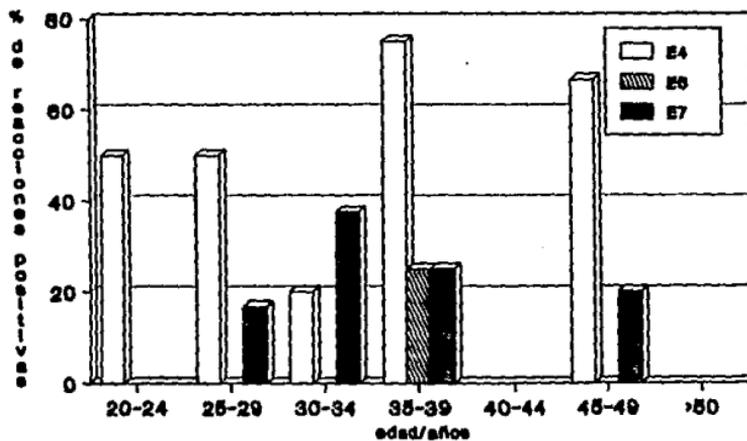
En general, los sueros positivos correspondieron a un 47.1% para E4, un 6.3% para E6 y 21.6% para E7. Los sueros control no mostraron reacción contra las proteínas víricas.

DISTRIBUCION DE LOS ANTICUERPOS CON RESPECTO A GRUPOS DE EDAD

Las reacciones positivas se distribuyeron con respecto a los grupos de edades de las pacientes como se muestra en la Gráfica 1. En los tres primeros grupos, los porcentajes más altos de sueros con anticuerpos fueron para E4, presentándose éstos entre las edades de 24 hasta 48 años. Un examen más detallado, mostrado en la Gráfica 2, indica que las reacciones positivas para E4 se encontraron en mayor porcentaje (75.0%) entre las edades de 35-39 años; los anticuerpos contra E6 sólo se presentaron también en



Gráfica 1. Distribución por edades (en grupos de 10 años) de pacientes seropositivos a proteínas E4, E6 y E7 de HPV16



Gráfica 2. Distribución por edades (en grupos de 5 años) de pacientes seropositivos a proteínas E4, E6 y E7 de HPV16

este mismo grupo. Regresando a la gráfica 1, los anticuerpos contra E7 se presentaron en los tres primeros grupos (al igual que E4) a partir de los 25 hasta los 48 años, siendo su mayor porcentaje de aparición en la gráfica 2 (37.5%), de 30-34 años.

El grupo de 50 años en adelante, constituido por una sola persona de 75 años y con cáncer de vulva, no presentó anticuerpos contra las proteínas virales.

**DISTRIBUCION DE LOS ANTICUERPOS CON RESPECTO A LESIONES
GENITALES ASOCIADAS CON HPV**

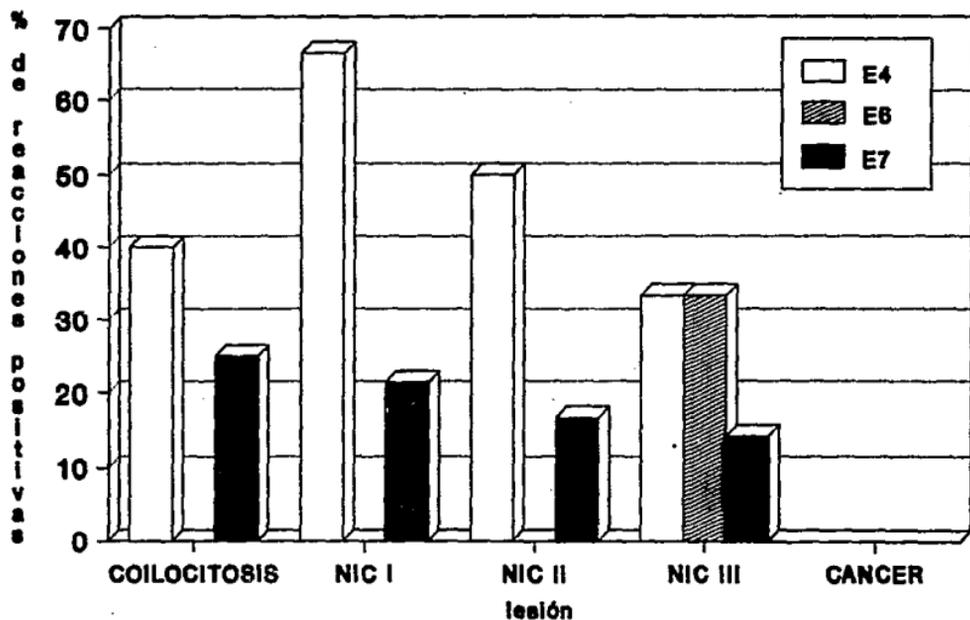
Con respecto a las lesiones asociadas a papilomavirus, los sueros arrojaron los siguientes resultados:

Diagnóstico	No. de sueros probados (% respectivo)	No. de sueros positivos	
		(% respectivo)	
		E4	E6
CONDILOMA	5 (31.3)	2 (40.0)	0
NIC I	6 (37.5)	4 (66.7)	0
NIC II	2 (12.5)	1 (50.0)	0
NIC III	3 (18.8)	1 (33.3)	1 (33.3)

En cuanto a las reacciones con la proteína E7, los resultados se muestran a continuación:

Diagnóstico	No. de sueros probados (% respectivo)	No. de sueros positivos
		(% respectivo)
CONDILOMA	8 (22.9)	2 (25.0)
NIC I	14 (40.0)	3 (21.4)
NIC II	6 (17.1)	1 (16.7)
NIC III	7 (20.0)	1 (14.3)

Los resultados anteriores se reflejan mejor en la Gráfica 3. Como se observa, los anticuerpos contra E4 y contra E7 se presentaron en todos los grados de lesiones no cancerosas asociadas con HPV, pero las pacientes con anticuerpos anti-E4 siempre predominaron en porcentaje sobre las pacientes con anticuerpos anti-E7. En NICs, las pacientes con anticuerpos contra E4 prevalecieron siempre más de 2 veces comparándose con aquellas con anticuerpos contra E7 (en NIC I y II incluso 3 veces). Los sueros positivos a E4 sumaron un 50% del total de pacientes con lesiones no cancerosas y un 54.5% entre los 3 grados de NICs, mientras que los sueros con anticuerpos anti-E7 sumaron sólo un 20 y 18.5% respectivamente. Además, se observa una baja en la proporción de sueros positivos contra ambas proteínas a medida que avanza la NIC. Para E7 la baja empieza incluso desde collocitosis. La proporción más baja de reacciones positivas para E4 y E7 fue en pacientes con NIC III, pero la más alta fue en NIC I y condiloma respectivamente. La reacción positiva a E6 se presentó en NIC III, sin embargo, el porcentaje fue más alto que para E7; el porcentaje con respecto al total de lesiones no cancerosas asociadas con HPV fue de 6.25%. La paciente con cáncer de vulva no presentó anticuerpos contra ninguna de las proteínas. Los resultados entre los sueros usados para las proteínas E4-E6 y E7 no son influenciados por la edad ya que el primer grupo (para E4-E6) de 17 personas tuvo un promedio de 37 años y el segundo grupo probado (para E7) con 37 personas tuvo un promedio de 36 años. Además ambos grupos presentaron



Gráfica 3. Distribución de reacciones seropositivas a E4, E6 y E7 con respecto a lesiones cervicales asociadas a HPV.

distribuciones semejantes en las lesiones (datos no mostrados).

Interesantemente, 2 pacientes de 33 y 48 años respectivamente y con NIC I, presentaron anticuerpos contra las proteínas E4 y E7. Nadie presentó anticuerpos contra las tres proteínas víricas al mismo tiempo.

Sorpresivamente, varios de los sueros probados contra la proteína de fusión cII-ras, la cual servía como un control interno, presentaron respuesta a la oncoproteína (alrededor del 56%). Estas reacciones se presentaron repartidas entre todas las edades y tipos de lesiones (incluyendo la de cáncer de vulva).

LAS PROTEINAS DE 110 Y 115 KD

Dados los antecedentes de la proteína de 115 kd, la cual se expresa diferencialmente en linfocitos de pacientes que sufren LLA con respecto a linfocitos normales, así como en linfocitos inducidos a proliferar con IL-2 y PHA y en líneas celulares transformadas como HeLa y Raji, se decidió conocer más sobre su naturaleza y al mismo tiempo sobre la proteína de 110 kd (que también intrigaba) con la que forma un doblete y que es expresada en células en general.

VIDA MEDIA DE LAS PROTEINAS DE 110 Y 115 KD

Originalmente se pensó que el doblete proteínico podría ser formas de las oncoproteínas Myc, ya que era reconocido por un anticuerpo dirigido contra una región altamente conservada en la familia de dicha oncoproteína.

Por lo anterior se quiso conocer la vida media de la proteína p115 así como la de p110.

0' 5' 10' 15' 20'

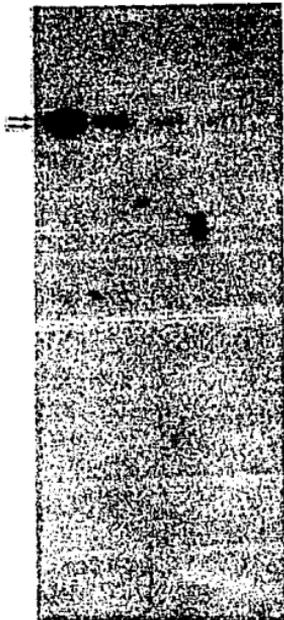


Figura 6. Vida media de las proteínas de 110 y 115 kd. El "Western blot" se realizó con células HeLa crecidas a confluencia e incubadas con cicloheximida [150 $\mu\text{g/ml}$] durante los tiempos señalados antes de rasparlas. El tiempo 0' no lleva cicloheximida. Se utilizó el anticuerpo anti-Myc 43-55.

Se sabe que las proteínas c-Myc y N-myc tienen una vida media de 20-30 minutos (Hann y Eisenman, 1984; Evan et al., 1988) y la proteína L-myc de 90 minutos (Evan et al., 1988). La vida media del doblete de 110 y 115 kd es de aproximadamente 5-10 minutos (Figura 6).

LOCALIZACION INTRACELULAR DE LAS PROTEINAS DE 110 Y 115 KD

Por otra parte, se deseaba conocer la localización celular del doblete de 110 y 115 kd. Para esto se realizó la técnica de extracción de núcleos descrito por Varshavsky y col. (1978).

El "Western" muestra que las dos proteínas aparentemente se encuentran sólo en el citoplasma (no se pueden descartar las membranas celulares) pero no en el núcleo (Figura 7). En un ensayo similar para saber la localización de la proteína c-Myc, se encontró que ésta se localiza en el núcleo (E. Garrido Guerrero, comunicación personal y manuscrito en preparación); además, hay reportes anteriores que apoyan esta observación para c-Myc y para otras proteínas Myc (Abrams et al., 1982; Donner et al., 1982; Hann y Eisenman, 1984; Evan et al., 1988).

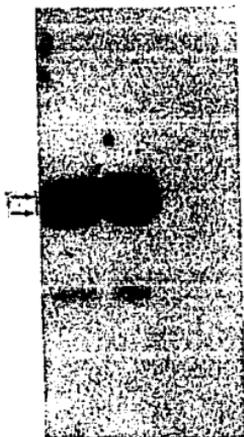
T E N

Figura 7. Localización extranuclear de las proteínas de 110 y 115 kd. "Western blot" realizado con células totales (T), material extranuclear (E) y núcleos (N) de células HeLa obtenidos mediante el método descrito por Varshavsky y col. (1978). Se utilizó el anticuerpo anti-Myc 43-55.

IDENTIFICACION DE CANDIDATAS EN LA BIBLIOTECA DE cDNA

Con respecto a la biblioteca de expresión, ésta parecía ser un medio adecuado para encontrar una clona que expresara la proteína de 115 kd.

El primer problema con el anticuerpo utilizado para la identificación de clonas en la biblioteca de cDNA, fue que éste parecía reconocer alguna o algunas proteínas propias de la lisis bacteriana provocada por el fago, ya que todas u.f.p. daban señal positiva (Figura 8, panel A). Esto se confirmó mediante un "Western" con el mismo anticuerpo, donde se observó que bacterias solas e infectadas con fagos lambda silvestres (sin inserto) compartían proteínas con bacterias infectadas con fagos de la biblioteca (datos no mostrados). Esto interfería en el reconocimiento. Para resolver este problema primeramente se absorbió el anticuerpo antes de utilizarse en la inmunodetección, como se describe en la parte de metodología. Esta absorción fue exitosa tal como se muestra en la Figura 8, donde se observa en la parte A al anticuerpo sin haberse absorbido, el cual reconoce a todas las u.f.p. calculadas y después de la absorción, en el panel B, donde sólo reconoce unas pocas u.f.p. calculadas. Esto serviría como un control negativo.

Para tener más confianza en las señales positivas, se realizaron todos los experimentos con dos filtros de nitrocelulosa cada vez, de manera que se tuviera un duplicado, tomándose sólo las señales positivas intensas que aparecieran simultáneamente en ambos filtros después de revelar la autorradiografía (Figura 9).

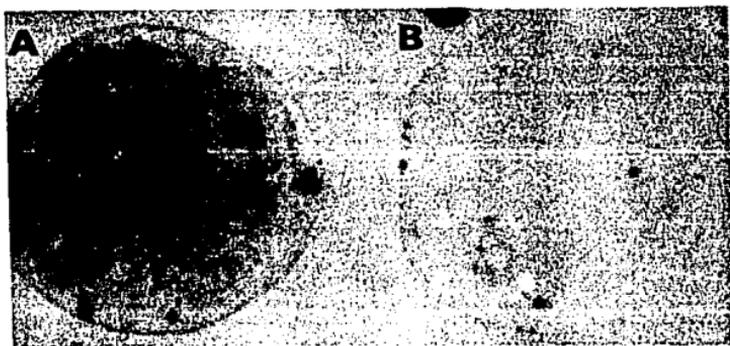


Figura 8. Absorción exitosa del anticuerpo. En el panel A se observa el anticuerpo anti-Myc 43-55 sin absorber (el cual reconoce todas la u.f.p. calculadas para la biblioteca de cDNA) y en el panel B el anticuerpo ya absorbido (reconociendo sólo unas pocas de las u.f.p. calculadas). Los detalles están descritos en materiales y métodos.

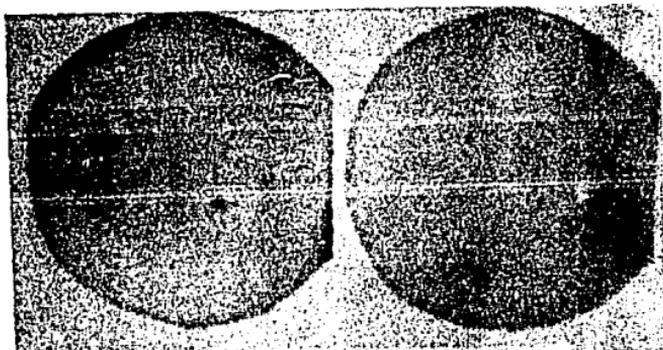


Figura 9. Las candidatas aparecieron por duplicado en cada experimento. Sólo se consideraron como señales positivas estas u.f.p. de cada caja que se tamizó, después de haberse preabsorbido el anticuerpo como se describe en materiales y métodos.

Estas señales se probaron una vez más de la misma manera, tomándose de cada ensayo las señales más claras y fuertes, para obtenerse finalmente un total de 12 candidatas, a partir de 7 cajas. Estas 12 candidatas fueron numeradas y llamadas desde la C6 hasta la C17.

Finamente, las señales positivas no son reconocimientos inespecíficos por parte de la proteína A de Staphylococcus aureus unida al ^{125}I , ya que 6 de las candidatas se probaron con la proteína marcada sin el anticuerpo, no obteniéndose señal alguna (Figura 10, panel A). Tampoco son reconocimientos inespecíficos del anticuerpo utilizado, ya que se probó una candidata con otro anticuerpo diferente, dirigido también contra la familia de oncoproteínas Myc pero que no reconoce al doblote, sin haber señal en este experimento tampoco (Figura 10, panel B).

AMPLIFICACION Y TITULO DE LAS CANDIDATAS

Para continuar posteriormente con la identificación de la clona que expresara mejor a la proteína de 115 kd, se amplificaron todas las candidatas y se calculó el título correspondiente de cada una. Este fue desde 1×10^7 u.f.p./ml para la de título más bajo (C13), hasta 2.6×10^9 u.f.p./ml, para la de título más alto (C15), lo cual es suficiente para seguir con futuros experimentos.

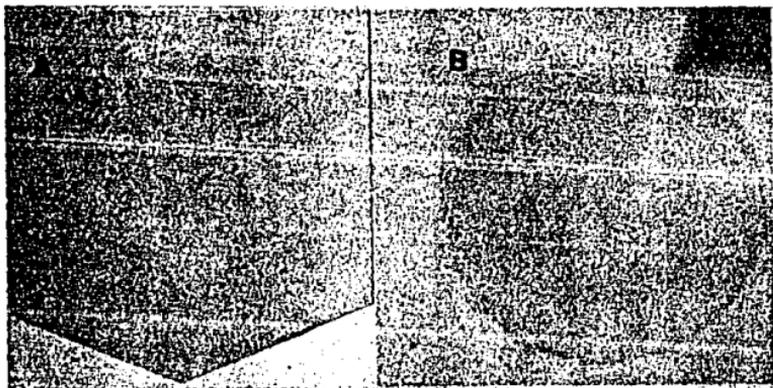


Figura 10. Las candidatas no son inespecificas al reconocimiento por el anticuerpo ni por la proteina A marcada con ^{125}I . En el panel A, se observa una candidata incubada sin el anticuerpo y con la proteina A- ^{125}I en condiciones iguales a las del tamizaje. En el panel B, una candidata con otro anticuerpo contra c-myc diferente al usado en el tamizaje.

DISCUSION

Los resultados presentados en esta tesis se dividen en dos: La primera parte se refiere a los anticuerpos contra las proteínas tempranas E4, E6 y E7 del HPV-16, encontrados en sueros de pacientes con lesiones precancerosas tipo NIC en grados I, II o III, y en sueros de pacientes con un tipo de lesión no cancerosa llamada condiloma cervical, la cual está asociada con la presencia de HPV (tipos 6 u 11).

La segunda parte se refiere al doblete proteico de 110 y 115 kd, reconocido por un anticuerpo anti-Myc, y al tamizaje de la proteína p115, la cual se presenta en los linfocitos de pacientes con LLA, así como en los estimulados a proliferar, y en líneas celulares cancerosas como HeLa y Raji.

Ambos estudios apuntan a la búsqueda y entendimiento de marcadores clínicos para dos tipos de cánceres: el cáncer cérvico uterino y la leucemia linfoblástica aguda.

ANTICUERPOS CONTRA LAS PROTEINAS TEMPRANAS DEL HPV-16

EN SUEROS DE LAS PACIENTES

Existe buena evidencia de que el condylomata acuminata y las lesiones tipo NIC (o al menos una proporción importante) son causadas por infecciones con papilomavirus (Gissmann et al., 1987; zur Hausen, 1988). Las neoplasias son, a su vez, las lesiones precursoras típicas de carcinomas cervicales, lo que inmediatamente implica un papel de estos virus en el CaCU. Además, se ha observado que el más alto riesgo de progresión en displasias cervicales está asociado con la presencia de HPV-16

(Syrjänen et al., 1986).

Con respecto a la primera parte de esta tesis, se controló la especificidad de la reacción de los anticuerpos a las proteínas tempranas de HPV-16 usando dos proteínas de fusión (MS2 y cII) para la misma proteína viral; todos los sueros tomados como positivos tuvieron que reaccionar en las dos pruebas. En la serie cII se usó también un control interno con esta proteína unida a v-Ha-ras para discriminar posibles anticuerpos contra cII. Además, la unión de anticuerpos a MS2 o cII pudo ser eliminada, al menos parcialmente, por la preabsorción del suero con la respectiva proteína de fusión sin el inserto de HPV.

Un aspecto importante es el hecho de que las consideraciones de señales positivas fueron realizadas por el autor y esto queda sujeto a que las observaciones sean subjetivas. Las sugerencias para ayudar a que estas observaciones puedan ser más objetivas son: (a) Aumentar la severidad de los lavados, para eliminar el fondo producido por la radioactividad y que interfiere en el reconocimiento de las señales positivas. Esto pudo ser efectivamente demostrado en un experimento que en condiciones normales de astringencia la señal se presentaba dudosa y en un segundo experimento, en condiciones similares pero lavando la tira con una astringencia más alta (aumentando la concentración de NaCl), pudo ser observada una señal muy clara (Figura 5, Panel C). (b) Las tiras correspondientes a cada suero probado, cortadas de las placas de autorradiografía, pueden ser colocadas en una máquina de lectura de densidad óptica para realizar una medición

real (scanning) y, de esta manera, que las observaciones sean cuantificables, pudiendo así discriminar con más confianza entre las señales y el fondo. Además, así se tendría una medición indirecta del título de los anticuerpos. (c) Utilizar también inmunoglobulinas anti-IgA, anti-IgG y anti-IgM humanas conjugadas con peroxidasa en la reacción del ^{125}I con cII ya que las diferencias con la serie MS2 (como en el caso de E4, en la que la mayor parte de los sueros reaccionaron con MS2-E4 en comparación con cII-E4) podrían ser debidas a la unión de la proteína A con IgGs solamente. (d) El hecho de que muchos casos sean dudosos al mismo tiempo para las dos proteínas de fusión indica posiblemente un bajo título de anticuerpos contra las proteínas virales y esto podría ser un impedimento para visualizar una posible respuesta. Por lo tanto, un ensayo de ELISA (ensayo del inmunsorbente acoplado a enzima) sería conveniente para titular previamente los anticuerpos y así poder realmente descartar que la reacción negativa no sea en realidad una señal muy débil. (e) Introducir un control interno con el inserto de fusión MS2, sin el de HPV, pero unido a otra proteína de peso diferente, para asegurar todavía más que la señal positiva en esta serie no sea debida a anticuerpos contra el péptido MS2.

Para la comprobación de los resultados presentados aquí, en futuros experimentos, será necesario utilizar una muestra más grande de pacientes y de mujeres sanas como controles. De preferencia todas de la misma zona para tener un mejor control de la población del lugar, y tomar también otros datos de las

pacientes (como hábito al tabaquismo, presencia de infecciones en el cérvix debidas a otros virus o bacterias o uso de anticonceptivos hormonales, ya que todos son factores de riesgo para el CaCU), además de la edad y el grado de lesión. Si fuera posible, una amplia distribución de edades para comparar entre las pacientes y las mujeres sanas ayudaría a la estandarización.

Los anticuerpos contra las proteínas E4 y E7 de HPV-16 se encontraron prácticamente en todas las distribuciones de edad de 20 a 50 años (Gráficas 1 y 2). Esto podría ser indicador de tres cosas interesantes: (1) Que la infección por HPV pudo ocurrir desde la adolescencia (o antes). (2) Que la respuesta inmune (cuando se lleva a cabo) tal vez se desarrolle a relativamente poco tiempo después de la infección en al menos algunos casos. (3) Que la distribución de edades para la detección de anticuerpos contra proteínas de HPV-16 es muy amplio. El primero y segundo puntos parecen ser apoyados por el hecho de que la mayor parte de las pacientes (81%) que se atienden en la clínica donde se recolectaron los sueros tienen su primera relación sexual a los 13-20 años (60% a los 16-20 años) (R. Velasco Santiago, comunicación personal). El tercer punto es importante por que así la edad parece no influir en la detección de los anticuerpos. Sin embargo, se observa una distribución desigual (que es independientes del grado de lesión) de las reacciones positivas con respecto a los grupos de edad.

En el caso de los anticuerpos anti-E7, se observa el máximo porcentaje de reacciones positivas a los 31-40 años, lo cual

coincide con lo observado por Jochmus-Kudielka y col. (1989). Esto podría, tal vez, mostrar una cinética de la respuesta inmune a estas proteínas con respecto al tiempo de la detección primaria, es decir, después del comienzo de la respuesta habría un período de ascenso y uno de respuesta máxima que posteriormente decae. La exposición constante a proteínas del virus también podría contribuir a un mayor grado de respuesta. Esto podría hacerse patente tanto en el porcentaje de reacciones positivas como en el título de los anticuerpos.

La proteína E4 (la cual se ha sugerido que está involucrada en la maduración del virión) fue escogida como un marcador para la replicación del HPV-16 (Jochmus-Kudielka et al., 1989). Los resultados muestran la presencia de anticuerpos contra la proteína E4 en pacientes con lesiones asociadas a HPV (Gráfica 3) y en todos los grupos de edad de 21-50 años (Gráfica 1), con una frecuencia más elevada que contra las proteínas E6 y E7. Se podría pensar que existiera reactividad cruzada con una proteína de otro tipo de virus infeccioso de humano. Se encontró anteriormente reportado una similitud entre la proteína E4 de HPV-16 y la supuesta proteína BPLF-1 del virus de Epstein-Barr. Esta similitud es más significativa que para cualquier otra proteína E4 de papilomavirus de secuencia disponible. Sin embargo, también en el mismo reporte se observó que no hubo reacción de anticuerpos anti-E4 contra la proteína BPLF-1 unida a una proteína de fusión β -gal, posiblemente excluyendo así una reacción cruzada con esta proteína (Jochmus-Kudielka et al.,

1989). Por otra parte, se podría pensar que el reconocimiento por los anticuerpos de los sueros no sea específico para la proteína E4 del HPV-16 sino para la proteína E4 de cualquier otro HPV involucrado en lesiones epiteliales. Sin embargo, la homología de aminoácidos entre tipos individuales de HPVs es mínima en E4 y los epítopes que reaccionan en las proteínas E4 del HPV-1 y del HPV-16 son completamente diferentes en secuencia (Jochmus-Kudielka et al., 1989). El hecho de que las reacciones contra E4 se encuentren siempre en tan alta proporción parece apoyar la hipótesis de que la expresión de la proteína E4 podría estar directamente relacionada a la cantidad de HPV en la célula (E4 es la proteína más predominante en verrugas de piel inducidas por HPV-1; Croissant et al., 1985; Doorbar et al., 1986), y sugeriría que la presencia de los anticuerpos anti-E4 pueden servir como un marcador primario de que hay o ha habido presencia activa de HPV-16.

Los anticuerpos anti-E6 sólo se presentaron en NIC III y en mayor porcentaje que los anticuerpos anti-E7. La baja proporción en comparación con el total de las reacciones positivas a E4 y a E7 es consistente con observaciones realizadas en otros laboratorios (L. Gissmann, comunicación personal). Con respecto a una posible reacción con proteínas E6 de otro HPV, Androphy y col. (1987) encontraron que anticuerpos contra E6 de HPV-16 no reconocían a E6 de HPV-18. Por otra parte, si se toma en cuenta que el HPV-16 se encuentra en México en un 31% de CaCUs (Gariglio et al., 1987), esto correlaciona con la reactividad contra E6 (1

de 3 pacientes con NIC III) y sugiere que los anticuerpos anti-E6 podrían ser un marcador para NIC de estadio avanzado, anterior a este tipo de cáncer. El porqué anticuerpos contra E6 sólo se encuentran en NIC III, podría ser tal vez explicado parcialmente en el hecho de que células NIH-3T3 transfectadas con el oncogene E6 de HPV-16 no son lisadas por macrófagos activados (Banks et al., 1991), por lo que tal vez la respuesta se llevaría a cabo sólo cuando la célula sea lisada por otros mecanismos como destrucción de la célula por medios mecánicos (roces o heridas) o tal vez su propia muerte, ya sea natural o debida al virus u por otra parte de la respuesta inmune. Otra explicación tal vez sería que E6 resultara poco inmunogénica y/o se necesitara una cierta concentración de esta proteína (que se alcanza hasta NIC III) para desencadenar la respuesta inmune. De hecho, la proteína E6 de HPV-16 se encuentra en mucho menor cantidad que E7 en las líneas celulares CaSki y SiHa (Seedorf et al., 1987). Resultaría muy atractiva la perspectiva de que si el resultado con E6 se pudiera extrapolar a una muestra mayor de casos, tal vez en un futuro podría utilizarse una mezcla de proteínas E6 de los tipos principales de HPV asociados con cáncer cervical para un buen diagnóstico y posiblemente hasta con un valor pronóstico.

El hecho que se hayan presentado 2 pacientes con anticuerpos contra E4 y E7 al mismo tiempo y que los anticuerpos contra E6 se presentaran sin haber al mismo tiempo anticuerpos contra otras proteínas virales también apoyaría, en parte, lo específico de la respuesta inmune a E6, apuntando tal vez a se llevan a cabo dos

mecanismos diferentes de respuesta inmune: uno temprano (para E4 y E7) y otro tardío (para E6).

Con respecto a anticuerpos contra E7, falta demostrar que éstos reconozcan específicamente a E7 de HPV-16 y no a una proteína E7 de otro HPV o incluso de otro virus. Por otro lado, al observar los resultados obtenidos con anticuerpos contra E7, es muy interesante el hecho de que los porcentajes de aparición de estos siempre observen una tendencia a la baja a medida que avanza el grado de lesión, desde condiloma hasta NIC III. Una explicación que parecería muy atractiva sería que los resultados muestran la importancia del sistema inmunológico en la detección e interrupción del avance de este tipo de lesiones como se explicará más adelante.

La presencia de anticuerpos contra E4 y E7 podría indicar un parámetro indirecto del estado del sistema inmune, de modo que pacientes con NIC III por HPV-16 y sin anticuerpos serán candidatas a desarrollar cáncer, pues señalan un defecto en la detección de células pre-cancerosas. De ser cierto esto, la propuesta es la siguiente: al observarse que el porcentaje de pacientes con anticuerpos contra E4 y E7 disminuye a medida que el grado de NIC avanza (o sea una relación inversamente proporcional), se podría sugerir que tejidos pre-cancerosos pueden ser destruidos (ya sea parcial o totalmente) en estadios tempranos más fácilmente que tejidos con un mayor grado de NIC (lo cual provocaría la liberación de las proteínas virales y la consiguiente formación de anticuerpos contra E4 y E7, que es lo

que observamos) y esto tal vez explicaría en parte porque son pocos los estadios tempranos de NIC que progresan a cáncer en comparación con los estadios más desarrollados. Dicho en otras palabras: tal vez muchos de los pacientes muestreados aquí estén o estuvieron infectados con HPV-16 y muchos llegaron a tener una respuesta (la mayor parte en estadios primarios y otros después) para primero detectar y posteriormente destruir las células infectadas antes de que éstas progresen a cáncer, por lo que, y como consecuencia de, un porcentaje muy significativo tiene anticuerpos anti-E7 y anti-E4. Los anticuerpos contra E4 y E7 no serían entonces la causa de la destrucción de la célula, sino más bien serían una consecuencia de ésta.

Debe ser más probable detener el proceso que conduce al cáncer en NIC I (y por esto el alto porcentaje de reacciones positivas para E4 y E7 en este estadio) que en NIC II (un porcentaje un poco más bajo) y este último más probable que en NIC III (por eso poca gente tuvo respuesta positiva en este estadio con respecto a los otros dos anteriores), lo que en conjunto podría explicar al menos parcialmente porque sólo un porcentaje de los individuos infectados con HPVs de alto riesgo desarrollan cáncer.

Hay otros casos que no presentan una respuesta inmune temprana o antes de que se establezca el CaCU. Probablemente existen 3 eventos por los que el sistema inmune no puede detener a las células infectadas por HPV-16 en el proceso de llegar a cáncer: (1) Un número muy alto de células infectadas con HPV-16

activo transcripcionalmente en relación a la capacidad de la respuesta de inmunidad celular para eliminar las células en proceso de transformación. (2) La respuesta inmune no sea efectiva (una condición llamada "escape inmunológico") para evitar que siga adelante el siguiente grado de lesión. (3) Una inmunosupresión ya sea local o general para detener que se llegue a establecer el CaCU. Una analogía con esto último se puede observar en mujeres durante o inmediatamente después de un embarazo en las que el cérvix y vagina se presentan con condilomas acuminata o verrugas genitales (muy probablemente provocadas por HPV de bajo riesgo) que desaparecen al recuperar las mujeres su estado inmunológico normal (R. Velasco Santiago, comunicación personal; observaciones personales). Tal vez se requiera sólo uno o la combinación de los factores mencionados. Esta falla del sistema inmune se debería presentar en determinados casos o condiciones (mala alimentación, enfermedades o infecciones, determinados medicamentos, etc., y estas condiciones tal vez se encuentren más en países en vías de desarrollo que en desarrollados) y esto podría explicar en parte por que muy poca gente originalmente infectada con HPV llega a desarrollar el CaCU y a tener anticuerpos anti-E7 en NIC III (ya que la mayor parte elimina a las células en proceso de transformación en estadios tempranos) y tal vez porque el CaCU es el cáncer predominante en países en vías de desarrollo.

La falla del sistema inmune puede estar apoyada por las observaciones de abatimiento de linfocitos intraepiteliales

(Syrjänen et al., 1987), T8+ y especialmente T4+ (Tay et al., 1987b), y de células de Langerhans (Tay et al., 1987a) en infecciones por HPV y en NICs, lo cual sugiere que en estos casos puede haber una inmunodeficiencia localizada que debilita la vigilancia y la respuesta inmune mediadas por células presentadoras de antígeno, lo cual permitiría al HPV replicar, expresarse en el cérvix y ejercer un efecto oncogénico, y que podría ser un paso anterior al desarrollo de CaCU.

La observación de que hay un gran número de casos con anticuerpos anti-E4 y anti-E7 desde estadios tempranos, como condiloma y NIC I, tal vez pueda ser explicado y apoyado por el hecho de que macrófagos activados *in vitro* lisan a fibroblastos transfectados con el oncogene E7 de HPV-16 (Banks et al., 1991). Todo parece indicar que probablemente el sistema inmune debe ser la última barrera antes de establecerse el cáncer.

La hipótesis del abatimiento del sistema inmune también podría explicar el porqué los factores de riesgo, como por ejemplo el tabaco, tienen una importancia en el desarrollo del CaCU, ya que se ha observado una disminución significativa en células presentadoras de antígeno en fumadores con respecto a no fumadores (Barton et al., 1988). Situaciones parecidas pueden darse en infecciones por otros virus o bacterias así como también por cambios hormonales.

El hecho de tener una infección como condiloma, típica de los HPV6 y 11, considerados como de bajo riesgo, no excluye el que las mujeres puedan estar (o haber estado) infectadas también con

el HPV-16, pero ser asintomáticas, lo que explicaría el encontrar anticuerpos contra este último en lesiones no cancerosas. De hecho, en nuestro laboratorio se ha observado por hibridación in situ que diferentes tipos de HPV pueden infectar el tejido cervical de mujeres.

Hasta ahora se tiene el esquema general en el que el HPV infecta a la o las células y en un momento dado los genes tempranos, entre los que se encuentran los oncogenes E6 y E7, se pueden empezar a expresar. Sin embargo, se ha apuntado hacia un mecanismo de vigilancia intracelular, por parte de genes celulares, que controla la expresión de HPV (zur Hausen, 1987). Este mecanismo puede ser el mecanismo de defensa que preceda a la respuesta inmune.

El modelo que se propondría sería el siguiente: en el momento en que el mecanismo negativo no pueda controlar la expresión del HPV (ya sea por que falle completamente o sea alterado parcialmente al menos, lo que es más probable), los genes tempranos se empiezan a transcribir y la célula también empieza a perder el control de ella misma. Esto ocasiona que la célula pierda sus funciones normales y su morfología cambie como una consecuencia de las transformaciones que se llevan a cabo en su interior (esto se puede ver en los NICs). Este cambio puede ser el mensaje de alerta para la inmunidad celular: la célula presenta antígenos de superficie que normalmente no expresa, pero entre ellos probablemente no están las proteínas tempranas del HPV (ya que estas son intracelulares). La inmunidad celular entra

en acción y destruyen la célula, participando seguramente también células "asesinas" o "natural killer" (NK) (Tay et al., 1987c). La célula libera su contenido, incluyendo las proteínas tempranas codificadas por el HPV-16. Estas proteínas, son procesadas por las células presentadoras de antígeno hacia los linfocitos T y B. Estos últimos son los encargados de llevar a cabo la respuesta inmune, o sea, de producir los anticuerpos que observamos en las reacciones positivas.

En este estudio no pudieron ser muestreados más que dos sueros de personas normales que sirvieron como controles, por lo que esto no sería una muestra representativa de la población normal. Sin embargo, sueros de gente normal obtenidos en Alemania, del mismo sexo y en el mismo rango de edad que los presentados aquí, y probados contra las mismas proteínas E4 y E7, mostraron porcentajes de 11.4 y 3.8% para cada proteína respectivamente; la proporción entre los sueros positivos a E4 y E7 de pacientes con lesiones asociadas a HPV con respecto a los controles dan una relación 2.9 y 1.7 respectivamente (Jochmus-Kudielka et al., 1989). Los resultados obtenidos en el presente trabajo comparados con los controles de Alemania representarían una proporción de 4.1 y 1.6 veces de los sueros positivos sobre los controles para E4 y E7 respectivamente. Encontrar anticuerpos en gente normal, contra las proteínas de HPV-16, no sería sorprendente si tomamos en cuenta la hipótesis de que el sistema inmune en mujeres sanas debió destruir las posibles células infectadas con el virus (con la consiguiente formación de

anticuerpos), evitando la evolución posterior a neoplasias.

En el caso de la paciente con cáncer de vulva, sin anticuerpos para alguna proteína viral, se puede decir que un solo caso no es significativo. Sin embargo, es importante hacer destacar que contra E7 la señal fue dudosa, lo que sugiere que puede haber un título bajo de anticuerpos contra esta oncoproteína y esto puede posteriormente ser comprobado. En caso de no presentarse anticuerpos, otras explicaciones posibles podrían ser: que este caso de cáncer en particular no fuera debido a HPV-16, que la respuesta inmune se desarrolle de manera diferente a la del cáncer cervical o que la edad de la paciente (75 años) intervenga en el la respuesta. Por otro lado, puede ser que la paciente no presente anticuerpos, o éstos estén en bajo título, debido a que no hubo la respuesta inmune adecuada a las células infectadas por HPV y esto, a su vez, facilitó la consiguiente formación del cáncer.

En Alemania, los anticuerpos contra E7 en pacientes con cáncer cervical se presentaron en un 20.5% (sin embargo, hay que tomar en cuenta que el HPV-16 se encuentra en un 61% de lesiones cancerosas, i. e., el doble que en México) y en un estudio reciente (Hashido et al., 1991) realizado en Japón (donde el HPV-16 se encuentra en el 34% de los casos, i. e., muy semejante al porcentaje en México), inmunoglobulinas IgG contra la proteína E7 de HPV-16 se encontraron en un 11%. Ambos resultados, extrapolados a los de este trabajo en México, representarían una baja con respecto al porcentaje de reacciones contra E7 en NIC

III y apoyaría la idea de la deficiencia inmunológica con respecto a los estadios más avanzados.

El siguiente paso en este proyecto es encontrar la prevalencia de anticuerpos anti-E4, anti-E6 y anti-E7 en tejidos y tumores infectados efectivamente con HPV-16, comprobación que se podría realizar por hibridación *in situ*, por "Southern blot" o por "Dot blot" con sondas específicas para HPV-16 y en tejidos y tumores no infectados con HPV-16 como controles (con HPV-18 por ejemplo).

Por otra parte, es muy interesante que se presentaran también anticuerpos contra la proteína v-Ha-ras. Esta observación es apoyada por la detección anterior de anticuerpos contra otras oncoproteínas en sueros de pacientes con cáncer (Ben-Mahrez et al., 1988) y podría sugerir una posible cooperación de ras y HPVs oncogénicos. Esta observación es tan atractiva que justifica futuras comprobaciones experimentales.

Finalmente, el haber utilizado también al ^{125}I acoplado a la proteína A para revelar la reacción de anticuerpos que se unieron a las proteínas virales, definitivamente aumento el número de reacciones positivas, por lo que es un sistema más sensible (y fue la razón por la que se escogió en la decisión de señales positivas). Esto se observa claramente comparando en la serie MS2 los 2 métodos (este método y el de anticuerpos anti-IgG, anti-IgA y anti-IgM, conjugados a peroxidasa). El ^{125}I detectó reacciones positivas que la peroxidasa no hizo, por lo que las diferencias de los resultados obtenidos en otros laboratorios (Jochmus-

Kudielka et al., 1989) con los nuestros pudieron deberse a lo mismo. El hecho de que el ^{125}I solo diera reacciones positivas en un alto número, indica que al menos una parte importante de la respuesta de anticuerpos contra las proteínas virales (al menos es muy evidente para E7) esta dada principalmente por IgG1, IgG2 e IgG4. Esto es consistente con el hecho de que las IgGs se encuentran en fluidos extra-vasculares (v. g., el epitelio cervical). Otra posible Ig que podría participar en la respuesta inmune a proteínas de HPV-16 sería la IgM, por producirse como respuesta inmune temprana y ser la primera línea de defensa.

LAS PROTEINAS DE 110 Y 115 KD

Con respecto al doblete proteico de 110 y 115 kd, en un principio se dudaba si era o no la proteína c-Myc o algun miembro en particular de la familia Myc. El hecho de que el doblete: (1) su peso no corresponda con c-Myc, ni con otra proteína de su familia (a excepción de gag-myc, una proteína de fusión de v-myc que pesa 110 kd y es codificada por los virus MC29, CMII y OK10), (2) no sea nuclear sino extranuclear (probablemente se localice en la membrana celular; E. Miranda Peralta, comunicación personal), (3) tenga una vida media aparentemente más corta que la reportada para los tres miembros de la familia Myc (c-myc, N-myc y L-myc; Evan et al., 1988), (4) no se disocie a concentraciones altas de agentes reductores en subunidades proteínicas de más bajo peso que se puedan relacionar al peso de alguna proteína Myc (E. Garrido Guerrero, comunicación personal y manuscrito en preparación) y (5) existe la posibilidad de que el

anticuerpo reconozca otro epítopo semejante al que comparten las proteínas de la familia Myc (observaciones personales), sugieren fuertemente que el doblete no es miembro de la familia de proteínas Myc, sino que son proteínas antigénicamente relacionadas. Sin embargo, es de gran interés el estudio de este doblete y particularmente de la proteína de 115 kd debido a que puede ser un posible marcador de proliferación celular y por lo tanto de leucemias y posiblemente de otros tipos de cánceres.

EL TAMIZAJE DE LA BIBLIOTECA DE cDNA

El tamizaje de la biblioteca dió como resultado 12 candidatas, las cuales están sujetas a comprobación antes de lanzarse a la búsqueda de aquella que codifique a la proteína de 115 kd.

Si tomamos en cuenta que el anticuerpo utilizado en pacientes con LLA reconoce 3 proteínas (y la biblioteca está construida en base a linfocitos B de leucemia), la probabilidad de contar con una candidata que exprese p115 es de 4 entre las 12 o sea de 1 cada 3 candidatas.

Existe la posibilidad de que no se encuentre la secuencia para la proteína completa sino sólo parcialmente o truncada, pero si tomamos en cuenta que la proteína por tener un peso de 115 kd teóricamente debe estar codificada por una secuencia de alrededor de 3 000 nucleótidos, y que la biblioteca puede aceptar tamaños de inserto de hasta 7.2 kb de DNA, existe una buena oportunidad de que se encuentre el tamaño completo. Recordando que la proteína se expresará como un inserto de fusión de β -

galactosidasa (y este debe pesar alrededor de 110 kd) la proteína de fusión completa deberá pesar aproximadamente entre 215 y 230 kd y deberá de ser de un tamaño mayor que las otras proteínas de fusión, probablemente reconocidas también por el anticuerpo (ya que p115 es la de mayor peso reconocida en ensayos de "Western blot").

Si esta estratagema no tuviera éxito, tal vez otra posibilidad sería intentar un método semejante al reportado por Prendergast y col. (1991), donde se usó la técnica de amplificación por PCR, usando diferentes "primers", en una librería de cDNA.

CONCLUSIONES

1. Los anticuerpos contra las proteínas tempranas E4, E6 y E7 de HPV-16, encontrados por "Western blot" en sueros de mujeres con lesiones cervicales asociadas a HPV, hasta donde se probaron, son específicos contra estas proteínas.

2. Los anticuerpos contra las proteínas E4 y E7 abarcan una amplia distribución de edades, lo que sugiere que en un buen número de casos se forman al poco tiempo de que ocurre la infección del HPV-16 (lo cual parece ser en la adolescencia en la población estudiada) y de que son detectadas por el sistema inmune.

3. Los anticuerpos contra la proteína temprana E4 parecen ser un indicador temprano de que hay o ha habido actividad del HPV-16.

4. Los anticuerpos contra la proteína temprana E6 sólo se presentaron en NIC III (la cual es el estadio anterior al CaCU), en proporción semejante a la presencia del HPV-16 en México, lo que sugiere que podrían ser potencialmente un indicador para la detección de neoplasias avanzadas debidas a este HPV.

5. La frecuencia de aparición de los anticuerpos contra E7 disminuye en la población, conforme se avanza en el grado de lesión, desde condiloma hasta NIC III. Esto sugiere que los anticuerpos contra la proteína temprana E7 podrían ser un indicador indirecto del estado del sistema inmune del paciente y parecen mostrar que los tejidos pre-cancerosos son más fácilmente eliminados en el estadio temprano de NIC I que en estados más

avanzados.

6. Los dos puntos anteriores sugieren que hay dos eventos en el reconocimiento inmunológico para las proteínas tempranas de HPV-16: uno temprano (para E4 y E7) y uno tardío (para E6).

7. Una parte importante de la respuesta inmune contra las proteínas tempranas del HPV-16 está mediada por inmunoglobulinas IgG.

8. Las proteínas de 110 y 115 kd probablemente no sean miembros de la familia Myc debido a su peso, vida media y localización intracelular, pero están antigénicamente relacionadas.

9. Se encontraron 12 candidatas del tamizaje de la biblioteca de cDNA de linfocitos B de leucemia las cuales fueron comprobadas con diferentes pruebas que muestran que son específicamente reconocidas por el anticuerpo que reconoce a la proteína de 115 kd.

BIBLIOGRAFIA

Abrams, H. D., Rohrschneider, L. R., and Eisenman, R. N. (1982). Nuclear location of the putative transforming protein of avian myelocytomatosis virus. *Cell* 29, 427-439.

American Cancer Society. (1976). *Cancer Word Book*.

Ames, B. N. (1979). Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer. *Science* 204, 587-593.

Antmann, E., and Sauer, G. (1982). Bovine papilloma virus transcription: polyadenylated RNA species and assessment of the direction of transcription. *J. Virol.* 43, 59-66.

Androphy, E. J., Schiller, J. T., and Lowy, D. R. (1985). Identification of the protein encoded by the E6 transforming gene of bovine papillomavirus. *Science* 230, 442-445.

Androphy, E. J., Hubbert, N. L., Schiller, J. T., and Lowy, D. R. (1987). Identification of the HPV-16 E6 protein from transformed mouse cells and human cervical carcinoma cell lines. *EMBO J.* 6, 989-992.

Baird, P. J. (1983). Serological evidence for the association of papillomavirus and cervical neoplasia. *Lancet* 2, 17-18.

Banks, L., Matlashewski, G., Pim, D., Churcher, M., Roberts, C., and Crawford, L. (1987a). Expression of human papillomavirus type 6 and type 16 capsid proteins in bacteria and their antigenic characterization. *J. Gen. Virol.* 68, 3081-3089.

Banks, L., Spence, P., Androphy, E., Hubbert, N., Matlashewski, G., Murray, A., and Crawford, L. (1987b). Identification of human papillomavirus type 18 E6 polypeptide in

cells derived from human cervical carcinomas. *J. Gen. Virol.* 68, 1351-1359.

Banks, L., Moreau, F., Vousden, K., Pim, D., and Matlashewski, G. (1991). Expression of the human papillomavirus E7 oncogene during cell transformation is sufficient to induce susceptibility to lysis by activated macrophages. *J. Immunol.* 146, 2037-2042.

Barbosa, M. S., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1989). Papillomavirus polypeptides E6 and E7 are zinc-binding proteins. *J. Virol.* 63, 1404-1407.

Barbosa, M. S., Edmonds, C., Fisher, C., Schiller, J. T., Lowy, D. R., and Vousden, K. H. (1990). The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and SV40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *EMBO J.* 9, 153-160.

Barbosa, M. S., Vass, W. C., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1991). *In vitro* biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J. Virol.* 65, 292-298.

Barton, S. E., Jenkins, D., Cuzick, J., Maddox, P. H., Edwards, R., and Singer, A. (1988). Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change?. *Lancet* 2, 652-654.

Becker, Y. (1980). The Epstein-Barr virus and human cancer. *En The Role of Viruses in Human Cancer, Vol. 1*, G. Giraldo and E. Beth, eds. (New York: Elsevier North Holland), pp. 7-27.

Beckmann, A. M., Daling, J. R., Sherman, K. J., Maden, C., Miller, B. A., Coates, R. J., Kiviat, N. B., Myerson, D., Weiss, N. S., Hislop, T. G., Beagrie, M., and McDougall, J. K. (1989). Human papillomavirus infection and anal cancer. *Int. J. Cancer* 43, 1042-1049.

Bedell, M. A., Jones, K. H., and Laimins, L. A. (1987). The E6-E7 region of human papillomavirus type 18 is sufficient for transformation of NIH 3T3 and Rat-1 cells. *J. Virol.* 61, 3635-3640.

Bedell, M. A., Jones, K. H., Grossman, S. R., and Laimins, L. A. (1989). Identification of human papillomavirus type 18 transforming genes in immortalized and primary cells. *J. Virol.* 63, 1247-1255.

Ben-Mahrez, K., Thierry, D., Sorokine, I., Danna-Muller, A., and Kohiyama, M. (1988). Detection of circulating antibodies against c-myc protein in cancer patient sera. *Br. J. Cancer* 57, 529-534.

Binétruy, B., Meneguzzi, G., Breathnach, R., and Cuzin, F. (1982). Recombinant DNA molecules comprising bovine papilloma virus type 1 DNA linked to plasmid DNA are maintained in a plasmidial state both in rodent fibroblasts and in bacterial cells. *EMBO J.* 1, 621-628.

Bishop, J. M. (1982a). Oncogenes. *Sci. Am.* 246(3), 80-92.

Bishop, J. M. (1982b). Retroviruses and cancer genes. *Adv. Cancer Res.* 37, 1-32.

Bishop, J. M. (1983). Cellular oncogenes and retroviruses.

Ann. Rev. Biochem. 52, 301-354.

Bishop, J. M. (1985). Viral oncogenes. Cell 42, 23-38.

Bishop, J. M. (1987a). The molecular genetics of cancer. Science 235, 305-311.

Bishop, J. M. (1987b). Trends in oncogenes. En Oncogenes and Growth Factors, R. A. Bradshaw and S. Prentis, eds. (Cambridge: Elsevier Science Publishers), pp. 1-10.

Bishop, J. M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. Cell 64, 235-248.

Boiron, M., Levy, J. P., Thomas, M., Friedmann, J. C., and Bernard, J. (1964). Some properties of bovine papilloma virus. Nature 201, 423-424.

Boshart, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., Kleinheinz, A., Scheurlen, W., and zur Hausen, H. (1984). A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. EMBO J. 3, 1151-1157.

Braval, L., y Slomianski, R. (1981). El tabaquismo. Inf. Cient. Tecnol. 3(52), 27-30.

Breitbart, F., Favre, M., Zoorob, R., Fortin, D., and Orth, G. (1981). Detection and characterization of viral genomes and search for tumoral antigens in two hamster cell lines derived from tumors induced by bovine papillomavirus type 1. Int. J. Cancer 27, 693-702.

Broker, T. R., and Botchan, M. (1986). Papillomaviruses: Retrospectives and Prospectives. En Cancer Cells, Vol. 6. DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication, M.

Botchan, T. Grodzicker, and P. A. Sharp, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 17-36.

Cairns, J. (1978). The Epidemiology of Cancer. En Cancer: Science and Society (USA: Freeman and Company), pp. 35-61.

Campo, M. S. (1988). Viral and cellular oncogenes in papillomavirus-associated cancers. Br. J. Cancer 58(Suppl. IX), 80-84.

Campo, M. S., and Jarrett, W. F. H. (1987). Papillomaviruses and disease. En Molecular Basis of Virus Disease, W. C. Russell and J. W. Almond, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 215-243.

Chong, T., Apt, D., Gloss, B., Isa, M., and Bernard, H.-U. (1991). The enhancer of human papillomavirus type 16: binding sites for the ubiquitous transcription factors oct-1, NFA, TEF-2, NF1, and AP-1 participate in epithelial cell-specific transcription. J. Virol. 55, 5933-5943.

Choo, K.-B., Pan, C.-C., and Han, S.-H. (1987). Integration of human papillomavirus type 16 into cellular DNA of cervical carcinoma: preferential deletion of the E2 gene and invariable retention of the long control region and the E6/E7 open reading frames. Virology 161, 259-261.

Chow, L. T., Pelletier, A. J., Galli, R., Brinckmann, U., Chin, M., Arvan, D., Campanelli, D., Cheng, S., and Broker, T. R. (1986). Transcription of human papillomavirus types 1 and 6. En Cancer Cells, Vol. 4. DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication, M. Botchan, T. Grodzicker, and P. A.

Sharp, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 603-614.

Chow, L. T., Hirochika, H., Nasser, M., Stoler, M. H., Wolinsky, S. M., Chin, M. T., Hirochika, R., Arvan, D. S., and Broker, T. R. (1987a). Human papillomavirus gene expression. In *Cancer Cells*, Vol. 5: Papillomaviruses, B. M. Steinberg, J. L. Brandsma, and L. B. Taichman, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 55-72.

Chow, L. T., Nasser, M., Wolinsky, S. M., and Broker, T. R. (1987b). Human papillomavirus types 6 and 11 mRNAs from genital condylomata acuminata. *J. Virol.* 61, 2581-2588.

Chow, L. T., Reilly, S. S., Broker, T. R., and Taichman, L. B. (1987c). Identification and mapping of human papillomavirus type 1 RNA transcripts recovered from plantar warts and infected epithelial cell cultures. *J. Virol.* 61, 1913-1918.

Cisneros de Cárdenas, M. T., Espinosa Romero, R., Pineda Corona, B. E., y González Caamaño, A. (1987). Mortalidad por cáncer de la mujer mexicana. *Salud Pública Méx.* 29, 299-312.

Coggin, J. R., and zur Hausen, H. (1979). Meeting report. Workshop on papillomaviruses and cancer. *Cancer Res.* 39, 545-546.

Cole, S. T., and Danos, O. (1987). Nucleotide sequence and comparative analysis of the human papillomavirus type 18 genome. Phylogeny of papillomaviruses and repeated structure of the E6 and E7 gene products. *J. Mol. Biol.* 191, 599-608.

Croissant, O., Breitburd, F., and Orth, G. (1985). Specificity of cytopathic effect of cutaneous human

papillomaviruses. *Clin. Dermatol.* 3(4), 43-55.

Crook, T., Morgenstern, J. P., Crawford, L., and Banks, L. (1989). Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras. *EMBO J.* 8, 513-519.

Cullen, A. P., Reid, R., Campion, M., and Lörincz, A. T. (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J. Virol.* 65, 606-612.

de Villiers, E.-M. (1989). Heterogeneity of the human papillomavirus group. *J. Virol.* 63, 4898-4903.

de Villiers, E.-M., Wagner, D., Schneider, A., Wesch, H., Miklaw, H., Wahrendorf, J., Papendick, U., and zur Hausen, H. (1987). Human papillomavirus infections in women with and without abnormal cervical cytology. *Lancet* 2, 703-706.

DeCaprio, J. A., Ludlow, J. W., Figge, J., Shew, J.-Y., Huang, C.-M., Lee, W.-H., Marsilio, E., Paucha, E., and Livingston, D. M. (1988). SV40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 54, 275-283.

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

Donner, P., Greiser-Wilke, I., and Moelling, K. (1982). Nuclear localization and DNA binding of the transforming gene

product of avian myelocytomatosis virus. *Nature* **296**, 262-266.

Doorbar, J., Campbell, D., Grand, R. J. A., and Gallimore, P. H. (1986). Identification of the human papilloma virus-1a E4 gene products. *EMBO J.* **5**, 355-362.

Dostatni, N., Thierry, F., and Yaniv, M. (1988). A dimer of BPV-1 E2 containing a protease resistant core interacts with its DNA target. *EMBO J.* **7**, 3807-3816.

Dulbecco, R. (1983). La naturaleza del cáncer. *Mundo Cient.* **2**, 168-179.

Dürst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., and zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3812-3815.

Dürst, M., Kleinheinz, A., Hotz, M., and Gissmann, L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J. Gen. Virol.* **66**, 1515-1522.

Dürst, M., Croce C. M., Gissmann L., Schwarz, E., and Huebner, K. (1987a). Papillomavirus sequences integrate near cellular oncogenes in some cervical carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 1070-1074.

Dürst, M., Dzarlieva-Petrusevska, R. T., Boukamp, P., Fusenig, N. E., and Gissmann, L. (1987b). Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* **1**, 251-256.

Dvoretzky, I., Shober, R., Chattopadhyay, S. K., and Lowy, D.

R. (1980). A quantitative *in vitro* focus assay for bovine papilloma virus. *Virology* 103, 369-375.

Dyson, J. L., Walker, P. G., and Singer, A. (1984). Human papillomavirus infection of the uterine cervix: histological appearances in 28 cases identified by immunohistochemical techniques. *J. Clin. Pathol.* 37, 126-130.

Dyson, N., Howley, P. M., Munger, K., and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937.

Edmonds, C., and Vousden, K. H. (1989). A point mutational analysis of human papillomavirus type 16 E7 protein. *J. Virol.* 63, 2650-2656.

Eliyahu, D., Michalovitz, D., Eliyahu, S., Pinhasi-Kimhi, O., and Oren, M. (1989). Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 8763-8767.

Engel, L. W., Heilman, C. A., and Howley, P. M. (1983). Transcriptional organization of bovine papillomavirus type 1. *J. Virol.* 47, 516-528.

Evan, G. I., Moore, J. P., Ibson, J. M., Waters, C. M., Hancock, D. C., and Littlewood, T. D. (1988). Immunological probes in the analysis of *myc* protein expression. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 141, 189-201.

Ewen, M. E., Ludlow, J. W., Marsilio, E., DeCaprio, J. A., Millikan, R. C., Cheng, S. H., Paucha, E., and Livingston, D. M. (1989). An N-terminal transformation-governing sequence of SV40 large T antigen contributes to the binding of both p110^{Rb} and a

second cellular protein, p120. *Cell* **58**, 257-267.

Fernández de Hoyos, R. M. (1983). ¿Cuáles son realmente las principales causas de defunción en México?. *Salud Pública Méx.* **25**, 241-264.

Feunteun, J. (1981). La carcinogénesis vírica. *Mundo Cient.* **1**, 4-13.

Figge, J., Webster, T., Smith, T. F., and Paucha, E. (1988). Prediction of similar transforming regions in simian virus 40 large T, adenovirus E1A, and *myc* oncoproteins. *J. Virol.* **62**, 1814-1818.

Finlay, C. A., Hinds, P. W., and Levine, A. J. (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57**, 1083-1093.

Firzlauff, J. M., Galloway, D. A., Eisenman, R. N., and Lüscher, B. (1989). The E7 protein of human papillomavirus type 16 is phosphorylated by casein kinase II. *New Biologist* **1**, 44-53.

Freese, U. K., Schulte, P., and Pfister, H. (1982). Papilloma virus-induced tumors contain a virus-specific transcript. *Virology* **117**, 257-261.

Fried, M., and Prives, C. (1986). The biology of simian virus 40 and polyomavirus. En *Cancer Cells*, Vol. 4. DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication, M. Botchan, T. Grodzicker, and P. A. Sharp, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 1-16.

Friend, S. H., Bernards, R., Rogelj, S., Weinberg, R. A., Rapaport, J. M., Albert, D. M., and Dryja, T. P. (1986). A human

DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 323, 643-646.

Friend, S. H., Horowitz, J. M., Gerber, M. R., Wang, X.-F., Bogenmann, E., Li, F. P., and Weinberg, R. A. (1987). Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence and its encoded protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9059-9063.

Fu, Y. S., Braun, L., Shah, K. V., Lawrence, W. D., and Robboy, S. J. (1983). Histological, nuclear DNA, and human papillomavirus studies of cervical condylomas. *Cancer* 52, 1705-1711.

Fuchs, P. G., Girardi, F., and Pfister. (1989). Human papillomavirus 16 DNA in cervical cancers and in lymph nodes of cervical cancer patients: a diagnostic marker for early metastases? *Int. J. Cancer* 41, 41-44.

Fukushima, M., Okagaki, T., Twiggs, L. B., Clark, B. A., Zachow, K. R., Ostrow, R. S., and Faras, A. J. (1985). Histological types of carcinoma of the uterine cervix and the detectability of human papillomavirus DNA. *Cancer Res.* 45, 3252-3255.

Gallo, R. C. (1987). El primer retrovirus humano. *Invest. Cienc.* (125), 44-55.

García-Carrancá, A., Thierry, F., and Yaniv, M. (1988). Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 62, 4321-4330.

García-Carrancá, A., y Gariglio, P. (1993). Aspectos

moleculares de los papilomavirus humanos y su relación con el cáncer cérvico-uterino. Rev. Inv. Clin. 45, 85-92.

Gariglio, P., Ocadiz, R., and Saucedo, R. (1987). Human papillomavirus DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uterine cervix carcinoma. En Cancer Cells, Vol. 5: Papillomaviruses, B. M. Steinberg, J. L. Brandsma, and L. B. Taichman, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 343-348.

Geraldes, A. (1969). Malignant transformation of hamster cells by cell-free extracts of bovine papillomas (*in vitro*). Nature 222, 1283-1284.

Gergely, L., Czeglédy, J., and Hernády, Z. (1987). Human papillomavirus frequency in normal cervical tissue. Lancet 2, 513.

Giri, I., and Danos, O. (1986). Papillomavirus genomes: from sequence data to biological properties. Trends Genet. 2, 227-232.

Gissmann, L. (1984). Papillomaviruses and their association with cancer in animals and in man. Cancer Surveys 3, 161-181.

Gissmann, L., and zur Hausen, H. (1980). Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*condylomata acuminata*). Int. J. Cancer 25, 605-609.

Gissmann, L., Wolnik, L., Ikenberg, H., Koldovsky, U., Schnürch, H. G., and zur Hausen, H. (1983). Human papillomavirus types 6 and 11 DNA sequences in genital and laryngeal papillomas and in some cervical cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 560-563.

Gissmann, L., and Schneider, A. (1986). Human papillomavirus DNA in preneoplastic and neoplastic genital lesions. En Banbury Report 21. Viral Etiology of Cervical Cancer, R. Peto and H. zur Hausen, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 217-224.

Gissmann, L., Dürst, M., Oltersdorf, T., and von Knebel Doeberitz, M. (1987). Human papillomaviruses and cervical cancer. En Cancer Cells, Vol. 5: Papillomaviruses, B. M. Steinberg, J. L. Brandsma, and L. B. Taichman, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 275-280.

Gius, D., Grossman, S., Bedell, M. A., and Laimins, L. A. (1988). Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. J. Virol. 62, 665-672.

Goldberg, R. J., and Gravell, M. (1976). A search for herpes simplex virus type 2 markers in cervical carcinoma. Cancer Res. 36, 795-799.

Gómez García, B. (1984). Infecciones en los humanos por el virus del herpes. Bol. Educ. Bioquim. 3(4), 11-16.

González-Garay, M. L., Avilés-Castro, L. B., Barrera-Saldaña, H. A., and Gariglio, P. V. (1989). Characterization of HPV-16 and 18 in uterine cervix carcinomas from two different mexican populations. J. Cell. Biochem. 13C(Suppl.), 186.

Halbert, C. L., Demers, G. W., and Galloway, D. A. (1991). The E7 gene of human papillomavirus type 16 is sufficient for immortalization of human epithelial cells. J. Virol. 65, 473-478.

Ham, H., Dostatni, N., Gauthier, J.-M., and Yaniv, M. (1991). The papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 440-440.

Hanawalt, P. C., and Sarasin, A. (1986). Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. *Trends Genet.* **2**, 124-129.

Hann, S. R., and Eisenman, R. N. (1984). Proteins encoded by the human c-myc oncogene: differential expression in neoplastic cells. *Mol. Cell. Biol.* **4**, 2486-2497.

Hashido, M., Kanda, T., Zanma, S., Watanabe, S., Komiyama, N., Yoshikawa, H., Yamaguchi, N., Kawana, T., and Yoshiike, K. (1991). Detection of human antibody against the human papillomavirus type 16 E7 protein. *Jpn. J. Cancer Res.* **82**, 1406-1412.

Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J.* **8**, 3905-3910.

Heilman, C. A., Law, M.-F., Israel, M. A., and Howley, P. M. (1980). Cloning of human papilloma virus genomic DNAs and analysis of homologous polynucleotide sequences. *J. Virol.* **36**, 395-407.

Heilman, C. A., Engel, L., Lowy, D. R., and Howley, P. M. (1982). Virus-specific transcription in bovine papillomavirus-transformed mouse cells. *Virology* **112**, 22-34.

Henderson, B. E., Ross, R. K., and Pike, M. C. (1991). Toward

the primary prevention of cancer. *Science* 254, 1131-1138.

Holly, E. A., Whittemore, A. S., Aston, D. A., Ahn, D. K., Nickoloff, B. J., and Kristiansen, J. J. (1989). Anal cancer incidence: genital warts, anal fissure or fistula, hemorrhoids, and smoking. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1726-1731.

Howley, P. M. (1991). Role of the human papillomaviruses in human cancer. *Cancer Res.* 51(Suppl.), 5019s-5022s.

Hudson, J. B., Bedell, M. A., McCance, D. J., and Laimins, L. A. (1990). Immortalization and altered differentiation of human keratinocytes *in vitro* by the E6 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 18. *J. Virol.* 64, 519-526.

Hunter, T. (1991). Cooperation between oncogenes. *Cell* 64, 249-270.

Hunter, T., and Cooper, J. A. (1985). Protein-tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 897-930.

Huynh, T. V., Young, R. A., and Davis, R. W. (1985). Constructing and screening cDNA libraries in λ gt10 and λ gt11. *En DNA cloning: a practical approach*, Vol. 1. D. M. Glover, ed. (Oxford: IRL Press Limited), pp. 49-77.

Imai, Y., Tsunokawa, Y., Sugimura, T., Terada, M. (1989). Purification and DNA-binding properties of human papillomavirus type 16 E6 protein expressed in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164, 1402-1410.

Jenson, A. B., and Lancaster, W. D. (1990). Association of human papillomavirus with benign, premalignant, and malignant anogenital lesions. *En Papillomaviruses and Human Cancer*, H.

Pfister, ed. (USA: CRC Press), pp. 11-45.

Jochmus-Kudielka, I., Schneider, A., Braun, R., Kimmig, R., Koldovsky, U., Schneeweis, K. E., Seedorf, K., and Gissmann, L. (1989). Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 81, 1698-1704.

Jochmus-Kudielka, I., and Gissmann, L. (1990). Expression of human papillomavirus type 16 proteins in *Escherichia coli* and their use as antigens in serological tests. *En Recombinant Systems in Protein Expression*, K. K. Alitalo, M.-L. Huhtala, J. Knowles, and A. Vaheri, eds. (Amsterdam: Elsevier Science Publishers), pp. 87-93.

Kanda, T., Watanabe, S., and Yoshiike, K. (1988). Immortalization of primary rat cells by human papillomavirus type 16 subgenomic DNA fragments controlled by the SV40 promoter. *Virology* 165, 321-325.

Kessler, I. I. (1976). Human cervical cancer as a venereal disease. *Cancer Res.* 36, 783-791.

Kidd, J. G., and Rous, P. (1940). Cancers deriving from the virus papillomas of wild rabbits under natural conditions. *J. Exp. Med.* 71, 469-494.

Kingston, R. E., Baldwin, A. S., and Sharp, P. A. (1985). Transcription control by oncogenes. *Cell* 41, 3-5.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lamberti, C., Morrissey, L. C., Grossman, S. R., and Androphy, E. J. (1990). Transcriptional activation by the papillomavirus E6 zinc finger oncoprotein. *EMBO J.* 2, 1907-1913.

Lancaster, W. D., and Olson, C. (1982). Animal papillomaviruses. *Microbiol. Rev.* 46, 191-207.

Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1983a). Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science* 222, 771-778.

Land, H., Parada, L. F., and Weinberg, R. A. (1983b). Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 304, 596-602.

Lane, D. P., and Crawford, L. V. (1979). T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 278, 261-263.

Law, M.-F., Lancaster, W. D., and Howley, P. M. (1979). Conserved polynucleotide sequences among the genomes of papillomaviruses. *J. Virol.* 32, 199-207.

Leal Guerrero, R., López López, S. A., Pedrotta Lopetegui, O., y Yofre Pizarro, R. (1985). Mortalidad diferencial en el Distrito Federal, 1978. *Salud Pública Méx.* 27, 308-321.

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

Levine, A. J., and Momand, J. (1990). Tumor suppressor genes: the p53 and retinoblastoma sensitivity genes and gene products. *Biochim. Biophys. Acta* 1032, 119-136.

Ley, C., Bauer, H. M., Reingold, A., Schiffman, M. H., Chambers, J. C., Tashiro, C. J., and Manos, M. M. (1991). Determinants of genital human papillomavirus infection in young women. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 997-1003.

Liebowitz, D., Wang, F., and Kieff, E. (1990). Epstein-Barr virus transformation of human B lymphocytes. In *Papillomaviruses*, P. M. Howley, and T. R. Broker, eds. (USA: Wiley-Liss), pp. 189-198.

Linzer, D. I. H., and Levine, A. J. (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 17, 43-52.

Lőrincz, A. T., Temple, G. F., Patterson, J. A., Jenson, A. B., Kurman, R. J., and Lancaster, W. D. (1986). Correlation of cellular atypia and human papillomavirus deoxyribonucleic acid sequences in exfoliated cells of the uterine cervix. *Obstat. Gynecol.* 68, 508-512.

Lőrincz, A. T., Quinn, A. P., Lancaster, W. D., and Temple, G. F. (1987). A new type of papillomavirus associated with cancer of the uterine cervix. *Virology* 152, 187-190.

Lowy, D. R., Dvoretzky, I., Shober, R., Law, M.-F., Engel, L., and Howley, P. M. (1980). *In vitro* tumorigenic transformation by a defined sub-genomic fragment of bovine papilloma virus DNA. *Nature* 287, 72-74.

Mallon, R. G., Wojciechowicz, D., and Defendi, V. (1987). DNA-binding activity of papillomavirus proteins. *J. Virol.* 61,

1655-1660.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 61, 68-73, 280.

Marshall, C. J. (1991). Tumor suppressor genes. *Cell* 64, 313-326.

Martin, R. G. (1981). The transformation of cell growth and transmutation of DNA synthesis by simian virus 40. *Adv. Cancer Res.* 34, 1-68.

Massing, A. M., and Epstein, W. L. (1963). Natural history of warts. A two-year study. *Arch. Dermatol.* 87, 306-310.

Matsukura, T., Koi, S., and Sugase, M. (1989). Both episomal and integrated forms of human papillomavirus type 16 are involved in invasive cervical cancers. *Virology* 172, 63-72.

McCance, D. J., Walker, P. G., Dyson, J. L., Coleman, D. V., and Singer, A. (1983). Presence of human papillomavirus DNA sequences in cervical intraepithelial neoplasia. *Br. Med. J.* 287, 784-788.

McCance, D. J., Kopan, R., Fuchs, E., and Laimins, L. A. (1988). Human papillomavirus type 16 alters human epithelial cell differentiation *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 7169-7173.

Meischke, H. R. C. (1979). *In vitro* transformation by bovine papilloma virus. *J. Gen. Virol.* 43, 473-487.

Melnick, J. L. (1962). Papova virus group. *Science* 135, 1128-1130.

Melnick, J. L., Allison, A. C., Butel, J. S., Eckhart, W., Eddy, B. E., Kit, S., Levine, A. J., Miles, J. A. R., Pagano, J. S., Sachs, L., and Vonka, V. (1974). Papovaviridae. *Intervirology* **3**, 106-120.

Miranda, I. E., Valles, Y., Gutiérrez, M., y Gariglio, P. (1988). Alteraciones del oncogene c-myc en pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA); análisis de los niveles de expresión. Memorias del XVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Bioquímica, A. C. (México), pp. 159.

Miranda Peralta, E. I., Valles Ayoub, Y., Hernández Mendoza, L., Rangel Ramírez, L. M., Castrejón Rojas, A., Collazo-Jaloma, J., Gutiérrez Romero, M., González Constance, R., y Gariglio Vidal, P. (1991). Estudio de la proteína MYC y de proteínas antigénicamente relacionadas a MYC en leucemia aguda linfoblástica (LAL). *Rev. Inv. Clín.* **43**, 139-45.

Morin, C., Braun, L., Casas-Cordero, M., Shah, K. V., Roy, M., Fortier, M., and Meisels, A. (1981). Confirmation of the papillomavirus etiology of condylomatous cervix lesions by the peroxidase-antiperoxidase technique. *J. Natl. Cancer Inst.* **66**, 831-835.

Münger, K., Phelps, W. C., Bubb, V., Howley, P. M., and Schlegel, R. (1989a). The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* **63**, 4417-4421.

Münger, K., Werness, B. A., Dyson, N., Phelps, W. C., Harlow,

E., and Howley, P. M. (1989b). Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 8, 4099-4105.

National Cancer Institute. (1984). Childhood Leukemia. pp. 20.

National Cancer Institute. (1985). Cancer of the Uterus. pp. 19.

Olper Palacci, R. (1975). Epidemiología de las neoplasias. *Salud Pública Méx.* 17, 543-553.

Olson, C. (1987). Animal papillomas. Historical perspectives. En *The Papovaviridae*, Vol. 2: The Papillomaviruses, N. P. Salzman and P. M. Howley, eds. (New York: Plenum Press), pp. 39-66.

Oltersdorf, T., Seedorf, K., Röwekamp, W., and Gissmann, L. (1987). Identification of human papillomavirus type 16 E7 protein by monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* 68, 2933-2938

Organización Mundial de la Salud. (1957). Clasificación Internacional de Enfermedades. Revisión 1955. Vol. 1: Manual de la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades, Traumatismos y Causas de Defunción. (Ginebra), pp. 7-10, 80-111.

Palmieri, S. (1989). Oncogene requirements for tumorigenicity: cooperative effects between retroviral oncogenes. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 148, 43-91.

Paul, W. E. (1984). The immune system: an introduction. En *Fundamental Immunology*, W. E. Paul, ed. (New York: Raven), pp. 3-22.

Pettersson, U., and Roberts, R. J. (1986). Adenovirus gene

expression and replication: a historical review. En *Cancer Cells*, Vol. 4. *DNA Tumor Viruses: Control of Gene Expression and Replication*, M. Botchan, T. Grodzicker, and P. A. Sharp, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 37-57.

Pettersson, U., Ahola, H., Stenlund, A., and Moreno-Lopez, J. (1987). Organization and expression of papillomavirus genomes. En *The Papovaviridae*, Vol. 2: *The Papillomaviruses*, N. P. Salzman and P. M. Howley, eds. (New York: Plenum Press), pp. 67-107.

Pfister, H. (1984). Biology and biochemistry of papillomaviruses. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 92, 111-181.

Pfister, H. (1987). Papillomaviruses. General description, taxonomy, and classification. En *The Papovaviridae*, Vol. 2: *The Papillomaviruses*, N. P. Salzman and P. M. Howley, eds. (New York: Plenum Press), pp. 1-38.

Pfister, H., and zur Hausen, H. (1978). Seroepidemiological studies of human papilloma virus (HPV-1) infections. *Int. J. Cancer* 21, 161-165.

Pfister, H., Huchthausen, B., Gross, G., and zur Hausen, H. (1979). Seroepidemiologic studies of bovine papillomavirus infections. *J. Natl. Cancer Inst.* 62, 1423-1425.

Phelps, W. C., Yee, C. L., Munger, K., and Howley, P. M. (1988). The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53, 539-547.

Piotti, S., Rilke, F., De Palo, G., Della Torre, G., and Alasio, L. (1981). Condylomata of the uterine cervix and

koilocytosis of cervical intraepithelial neoplasia. *J. Clin. Pathol.* 34, 532-541.

Pilotti, S., Rilke, F., Alasio, L., and Fontanelli, R. (1982). Histologic evidence for an association of cervical intraepithelial neoplasia with human papilloma virus infection. *Diagn. Gynecol. Obstet.* 4, 357-362.

Pilotti, S., Della Torre, G., Rilke, F., De Palo, G., and Shah, K. V. (1984). Immunohistochemical and ultrastructural evidence of papilloma virus infection associated with *in situ* and microinvasive squamous cell carcinoma of the vulva. *Am. J. Surg. Pathol.* 8, 751-761.

Pim, D., Collins, M., and Banks, L. (1992). Human papillomavirus type 16 E5 gene stimulates the transforming activity of the epidermal growth factor receptor. *Oncogene* 7, 27-32.

Pirisi, L., Yasumoto, S., Feller, M., Doniger, J., and DiPaolo, J. A. (1987). Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* 61, 1061-1066.

Ponder, B. A. J. (1990). Inherited predisposition to cancer. *Trends Genet.* 6, 213-218.

Prendergast, G. C., Lawe, D., and Ziff, E. B. (1991). Association of Myn, the murine homolog of Max, with c-Myc stimulates methylation-sensitive DNA binding and Ras cotransformation. *Cell* 65, 395-407.

Ramsay, G., Evan, G. I., and Bishop, J. M. (1984). The

protein encoded by the human proto-oncogene c-myc. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 7742-7746.

Rassoulzadegan, M., Cowie, A., Carr, A., Glaichenhaus, N., Kamen, R., and Cuzin, F. (1982). The roles of individual polyoma virus early proteins in oncogenic transformation. Nature 300, 713-718.

Rawls, W. E., Tompkins, W. A. F., Figueroa, M. E., and Melnick, J. L. (1968). Herpesvirus type 2: association with carcinoma of the cervix. Science 161, 1255-1256.

Reagan, J. W., Seidemann, I. L., and Saracusa, Y. (1953). The cellular morphology of carcinoma in situ and dysplasia or atypical hyperplasia of the uterine cervix. Cancer 6, 224-235.

Reitz, M. S. (1990). Human T-cell leukemia virus, type 1, and human leukemia and lymphoma. In Molecular Genetics in Cancer Diagnosis, J. Cossman, ed. (New York: Elsevier), pp. 163-178.

Remaut, E., Stanssens, P., and Fiers, W. (1981). Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the P_L promoter of coliphage lambda. Gene 15, 81-93.

Remaut, E., Stanssens, P., and Fiers, W. (1983a). Inducible high level synthesis of mature human fibroblast interferon in Escherichia coli. Nucleic Acids Res. 11, 4677-4688.

Remaut, E., Tsao, H., and Fiers, W. (1983b). Improved plasmid vectors with a thermoinducible expression and temperature-regulated runaway replication. Gene 22, 103-113.

Richart, R. M. (1967). Natural history of cervical intraepithelial neoplasia. Clin. Obstet. Gynecol. 10, 748-784.

Rotkin, I. D. (1973). A comparison review of key epidemiological studies in cervical cancer related to current searches for transmissible agents. *Cancer Res.* **33**, 1353-1367.

Ruley, H. E. (1983). Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature* **304**, 602-606.

Ruley, H. E. (1990). Transforming collaborations between ras and nuclear oncogenes. *Cancer Cells* **2**, 258-268.

Rulison, R. H. (1942). Warts. A statistical study of nine hundred and twenty-one cases. *Arch. Dermatol. Syphilol.* **46**, 66-81.

Sarasin, A. (1981). El cáncer y la reparación del ADN. *Mundo Cient.* **1**, 724-737.

Sarnow, P., Ho, Y. S., Williams, J., and Levine, A. J. (1982). Adenovirus E1b-58kd tumor antigen and SV40 large tumor antigen are physically associated with the same 54 kd cellular protein in transformed cells. *Cell* **28**, 387-394.

Sato, H., Watanabe, S., Furuno, A., and Yoshiike, K. (1989). Human papillomavirus type 16 E7 protein expressed in *Escherichia coli* and monkey COS-1 cells: immunofluorescence detection of the nuclear E7 protein. *Virology* **170**, 311-315.

Sawyers, C. L., Denny, C. T., and Witte, O. N. (1991). Leukemia and the disruption of normal hematopoiesis. *Cell* **64**, 337-350.

Scautres, C. (1981). La detección del cáncer. *Mundo Cient.* **1**, 1004-1016.

Schaffner, W., and Weissmann, C. (1973). A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* 56, 502-514.

Scheffner, M., Werness, B. A., Huibregtse, J. M., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 63, 1129-1136.

Schlegel, R. (1990). Papillomaviruses and human cancer. *Seminars in Virology* 1, 297-306.

Schlegel, R., Phelps, W. C., Zhang, Y.-L., and Barbosa, M. (1988). Quantitative keratinocyte assay detects two biological activities of human papillomavirus DNA and identifies viral types associated with cervical carcinoma. *EMBO J.* 7, 3181-3187.

Schneider-Gädicke, A., and Schwarz, E. (1986). Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J.* 5, 2285-2292.

Scholl, S. M., Kingsley Pillers, E. M., Robinson, R. E., and Farrell, P. J. (1985). Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in cervical carcinoma samples in East Anglia. *Int. J. Cancer* 35, 215-218.

Schreier, A. A., and Gruber, J. (1987). Meeting Highlights. Transformation mechanisms of papillomaviruses. *J. Natl. Cancer Inst.* 78, 779-784.

Schwarz, E., Freese, U. K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and zur Hausen, H. (1985).

Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314, 111-114.

Schwarz, E., Schneider-Gädicke, A., Roggenbuck, B., Mayer, W., Gissmann, L., and zur Hausen, H. (1986). Expression of human papillomavirus DNA in cervical carcinoma cell lines. En Banbury Report 21. *Viral Etiology of Cervical Cancer*, R. Peto and H. zur Hausen, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 281-290.

Secretaría de Salud. (1990). Anuario Estadístico 1989. (México), pp. 91, 95 y 310.

Sedman, S. A., Barbosa, M. S., Vass, W. C., Hubbert, N. L., Hass, J. A., Lowy, D. R., and Schiller, J. T. (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J. Virol.* 65, 4860-4866.

Seedorf, K., Krämer, G., Dürst, M., Suhai, S., and Röwekamp, W. G. (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* 145, 181-185.

Seedorf, K., Oltersdorf, T., Krämer, G., and Röwekamp, W. (1987). Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *EMBO J.* 6, 139-144.

Sherman, M., and Shafritz, D. A. (1990). Hepatocellular carcinoma and the role of hepatitis B virus. En *Molecular Genetics in Cancer Diagnosis*, J. Cossman, ed. (New York:

Elsevier), pp. 349-367.

Smotkin, D., and Wettstein, F. O. (1986). Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and a cancer-derived cell line and identification of the E7 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4680-4684.

Sousa, R., Dostatni, N., and Yaniv, M. (1990). Control of papillomavirus gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1032, 19-37.

Spalholz, B. A., and Howley, P. M. (1989). Papillomavirus-host cell interactions. En *Advances in Viral Oncology*, Vol. 8, G. Klein, ed. (New York: Raven Press), pp. 27-53.

Stanbridge, E. J., Der, C. J., Doersen, C.-J., Nishimi, R. Y., Peehl, D. M., Weissman, B. E., and Wilkinson, J. E. (1982). Human cell hybrids: analysis of transformation and tumorigenicity. *Science* 215, 252-259.

Storey, A., Pim, D., Murray, A., Osborn, K., Banks, L., and Crawford, L. (1988). Comparison of the *in vitro* transforming activities of human papillomavirus types. *EMBO J.* 7, 1815-1820.

Sundberg, J. P., and O'Banion, M. K. (1989). Animal papillomaviruses associated with malignant tumors. En *Advances in Viral Oncology*, Vol. 8, G. Klein, ed. (New York: Raven Press), pp. 55-71.

Syrjänen, K. J. (1983). Human papillomavirus lesions in association with cervical dysplasias and neoplasias. *Obstet. Gynecol.* 62, 617-624.

Syrjänen, K., de Villiers, E.-M., Saarikoski, S., Castren,

O., Väyrynen, M., Mäntyjärvi, R., and Parkkinen, S. (1985). Cervical papillomavirus infection progressing to invasive cancer in less than three years. *Lancet* **1**, 510-511.

Syrjänen, K., Mäntyjärvi, R., Parkkinen, S., Väyrynen, M., Saarikoski, S., Syrjänen, S., and Castrén, O. (1986). Prospective follow-up in assessment of the biological behavior of cervical HPV-associated dysplastic lesions. En *Banbury Report 21. Viral Etiology of Cervical Cancer*, R. Peto and H. zur Hausen, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 167-177.

Syrjänen, K., Mäntyjärvi, R., Väyrynen, M., Syrjänen, S., Parkkinen, S., Yliskoski, M., Saarikoski, S., Sarkkinen, H., Nurmi, T., and Castrén, O. (1987). Assessing the biological potential of human papillomavirus infections in cervical carcinogenesis. En *Cancer Cells, Vol. 5: Papillomaviruses*, B. M. Steinberg, J. L. Brandsma, and L. B. Taichman, eds. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 281-289.

Syvertson, J. T. (1952). The pathogenesis of the rabbit papilloma-to-carcinoma sequence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **54**, 1126-1140.

Taichman, L. B., and LaPorta, R. F. (1987). The expression of papillomaviruses in epithelial cells. En *The Papovaviridae, Vol. 2: The Papillomaviruses*, N. P. Salzman and P. M. Howley, eds. (New York: Plenum Press), pp. 109-139.

Takebe, N., Tsunokawa, Y., Nozawa, S., Terada, M., and Sugimura, T. (1987). Conservation of E6 and E7 regions of human papillomavirus types 16 and 18 present in cervical cancers.

Biochem. Biophys. Res. Commun. **142**, 837-844.

Tanaka, A., Noda, T., Yajima, H., Hatanaka, M., and Ito, Y. (1989). Identification of a transforming gene of human papillomavirus type 16. *J. Virol.* **63**, 1465-1469.

Tay, S. K., Jenkins, D., Maddox, P., Campion, M., and Singer, A. (1987a). Subpopulations of Langerhans' cells in cervical neoplasia. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **94**, 10-15.

Tay, S. K., Jenkins, D., Maddox, P., and Singer, A. (1987b). Lymphocyte phenotypes in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **94**, 16-21.

Tay, S. K., Jenkins, D., and Singer, A. (1987c). Natural killer cells in cervical intraepithelial neoplasia and human papillomavirus infection. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **94**, 901-906.

Thierry, F., and Yaniv, M. (1987). The BPV1-E2 trans-acting protein can be either an activator or a repressor of the HPV18 regulatory region. *EMBO J.* **6**, 3391-3397.

Thomas, M., Boiron, M., Tanzer, J., Levy, J. P., and Bernard, J. (1964). *In vitro* transformation of mice cells by bovine papilloma virus. *Nature* **202**, 709-710.

Tidy, J. A., Parry, G. C. N., Ward, P., Coleman, D. V., Peto, J., Malcolm, A. D. B., and Farrel, P. J. (1989). High rate of human papillomavirus type 16 infection in cytologically normal cervixes. *Lancet* **1**, 434.

Tiollais, P., y Dejean, A. (1986). El virus de la hepatitis B. *Mundo Cient.* **6**, 26-35.

Tomita, Y., Shirasawa, H., and Simizu, B. (1987). Expression of human papillomavirus types 6b and 16 L1 open reading frames in *Escherichia coli*: detection of a 56,000-dalton polypeptide containing genus-specific (common) antigens. *J. Virol* 51, 2389-2394.

Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

Tsunokawa, Y., Takebe, N., Nozawa, S., Kasamatsu, T., Gissmann, L., zur Hausen, H., Terada, M., and Sugimura, T. (1986). Presence of human papillomavirus type-16 and type-18 DNA sequences and their expression in cervical cancers and cell lines from Japanese patients. *Int. J. Cancer* 37, 499-503.

Turner, M. J., Cresswell, P., Parham, P., and Strominger, J. L. (1975). Purification of papain-solubilized histocompatibility antigens from a cultured human lymphoblastoid line, RPMI 4265. *J. Biol. Chem.* 250, 4512-4519.

Varmus, H. E. (1984). The molecular genetics of cellular oncogenes. *Ann. Rev. Genet.* 18, 553-612.

Varshavsky, A. J., Sundin, O. H., and Bohn, M. J. (1978). SV40 viral minichromosome: preferential exposure of the origin of replication as probed by restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res.* 5, 3469-3477.

von Knebel Doeberitz, M., Oltersdorf, T., Schwarz, E., and Gissmann, L. (1988). Correlation of modified human papilloma

virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res.* **48**, 3780-3786.

Vonka, V., Kanka, J., and Roth, Z. (1987). Herpes simplex type 2 virus and cervical neoplasia. *Adv. Cancer Res.* **48**, 149-191.

Vousden, K. H., Doniger, J., DiPaolo, J. A., and Lowy, D. R. (1988). The E7 open reading frame of human papillomavirus type 16 encodes a transforming gene. *Oncogene Res.* **3**, 167-175.

Vousden, K. H., Androphy, E. J., Schiller, J. T., and Lowy, D. R. (1989). Mutational analysis of bovine papillomavirus E6 gene. *J. Virol.* **63**, 2340-2342.

Watanabe, S., and Yoshiike, K. (1988). Transformation of rat 3Y1 cells by human papillomavirus type-18 DNA. *Int. J. Cancer* **41**, 896-900.

Watanabe, S., Kanda, T., and Yoshiike, K. (1989). Human papillomavirus type 16 transformation of primary human embryonic fibroblasts requires expression of open reading frames E6 and E7. *J. Virol.* **63**, 965-969.

Weber, K., Pringle, J. R., and Osborn, M. (1972). Measurement of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gel. *Methods. Enzymol.* **25**(C), 3-27.

Weinberg, R. A. (1989). Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. *Cancer Res.* **49**, 3713-3721.

Werness, B. A., Levine, A. J., and Howley, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins

with p53. *Science* **248**, 76-79.

Whyte, P., Buchkovich, K. J., Horowitz, J. M., Friend, S. H., Raybuck, M., Weinberg, R. A., and Harlow, E. (1988). Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* **334**, 124-129.

Whyte, P., Williamson, N. M., and Harlow, E. (1989). Cellular targets for transformation by the adenovirus E1A proteins. *Cell* **56**, 67-75.

Woodworth, C. D., Doniger, J., and DiPaolo, J. A. (1989). Immortalization of human foreskin keratinocytes by various human papillomavirus DNAs corresponds to their association with cervical carcinoma. *J. Virol.* **63**, 159-164.

World Health Organization. (1970). Mortality from Malignant Neoplasms. 1955-1965. Number of Deaths by site, sex and age. Part II, (Switzerland), pp. 964-971.

World Health Organization. (1978). International Classification of Diseases. Basic Tabulation List with Alphabetical Index. Ninth Revision, (Switzerland), pp. 212-219.

World Health Organization. (1984). World Health Statistics Annual 1984, (England), pp. 6-7.

World Health Organization. (1986). World Health Statistics Annual 1986, (England), pp. 9, 24-28.

World Health Organization. (1987). World Health Statistics Annual 1987, (England), pp. 9, 30-32.

World Health Organization. (1988). World Health Statistics

Annual 1988, (England), pp. 6, 17-20.

World Health Organization. (1989). World Health Statistics Annual 1989, (England), pp. 204-207.

World Health Organization. (1991). World Health Statistics Annual 1990, (Switzerland), pp. 5, 25-26, 104-105.

Yee, C., Krishnan-Hewlett, I., Baker, C. C., Schlegel, R., and Howley, P. M. (1985). Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am. J. Pathol.* 112, 361-366.

Yoshikawa, H., Toshihiko, M., Yamamoto, E., Kawana, T., Mizuno, M., and Yoshiike, K. (1985). Occurrence of human papillomavirus type 16 and 18 DNA in cervical carcinomas from Japan: age of patients and histological type of carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* 76, 667-671.

Young, R. A., and Davis, R. W. (1983a). Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 1194-1198.

Young, R. A., and Davis, R. W. (1983b). Yeast RNA polymerase II genes: isolation with antibody probes. *Science* 222, 778-782.

Yunis, J. J. (1983). The chromosomal basis of human neoplasia. *Science* 221, 227-236.

zur Hausen, H. (1980). Papilloma viruses. En *Molecular Biology of Tumor Viruses, Part 2. DNA Tumor Viruses. Second Edition*, J. Tooze, ed. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory), pp. 371-382.

zur Hausen, H. (1985). Genital papillomavirus infections. En

Viruses and Cancer, P. W. J. Rigby and N. M. Wilkie, eds. (Cambridge: Cambridge University Press), pp. 83-90.

zur Hausen, H. (1986). Intracellular surveillance of persisting viral infections. Human genital cancer results from deficient cellular control of papillomavirus gene expression. *Lancet* **2**, 489-491.

zur Hausen, H. (1987). Papillomaviruses in human cancer. *Cancer* **52**, 1692-1696.

zur Hausen, H. (1988). Papillomaviruses in human cancers. *Mol. Carcinogenesis* **1**, 147-150.

zur Hausen, H. (1989a). Papillomavirus in anogenital cancer: the dilemma of epidemiologic approaches. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 1680-1682.

zur Hausen, H. (1989b). Papillomaviruses as carcinomaviruses. En *Advances in Viral Oncology*, Vol. 8, G. Klein, ed. (New York: Raven Press), pp. 1-26.

zur Hausen, H. (1991). Viruses in human cancers. *Science* **254**, 1167-1173.

zur Hausen, H., and Schneider, A. (1987). The role of papillomaviruses in human anogenital cancer. En *The Papovaviridae*, Vol. 2: The Papillomaviruses, N. P. Salzman and P. M. Howley, eds. (New York: Plenum Press), pp. 245-263.

ANEXO 1

SOLUCIONES

ANTIBIOTICOS

Ampicilina

Se preparó a concentración de 25 mg/ml en agua. Se esterilizó por filtración.

Penicilina

Se resuspendió una ampollita de 1 000 000 U en 5 ml de agua bidestilada estéril. Se almacenó a -20 °C.

Estreptomicina

Se resuspendió una ampollita de 1 g en 5 ml de agua bidestilada estéril. Se almacenó a -20 °C.

MEDIO LB (LURIA-BERTANI) CON AMPICILINA

Bacto-triptona (Difco)	1%
Extracto de bacto-levadura (Difco)	0.5%
NaCl	1%

La mezcla se ajustó a pH 7.0 con NaOH (1 ml 2M/litro) y se autoclaveó. Finalmente, se dejó enfriar y se agregó ampicilina [50 µg/ml].

MEDIO LB CON AGAR

Se preparó medio LB de acuerdo a la fórmula de arriba y antes de autoclavearlo se agregó

Bacto-agar	1.5%
------------	------

La mezcla se autoclaveó y se dejó enfriar hasta 55 °C antes de agregar la ampicilina [50 µg/ml]. Se vació en cajas desechables de petri de 85 mm. Las burbujas se rompieron flameando la superficie del medio con un mechero bunsen antes de que el agar endureciera.

TOP AGAROSA Y TOP AGAR

Se preparó medio LB de acuerdo a la fórmula de arriba y antes de autoclavearlo se agregó

Agarosa (tamizaje)	0.7%
Agar-agar (amplificación y titulación)	0.7%

La mezcla se autoclaveó y se almacenó. Antes de usarse se fundió, se agregó maltosa al 0.2% final, y se dejó enfriar a aproximadamente 55 °C para adicionarse a las bacterias infectadas con fagos.

AMORTIGUADO SALINO DE FOSFATO
(PBS o phosphate-buffered saline)

NaCl	0.8%
KH ₂ PO ₄	0.02%
Na ₂ HPO ₄	0.115%
KCl	0.02%

Se ajustó el pH a 7.4 con NaOH. Se esterilizó por filtración con membrana Millipore 0.45 μ m. En el caso del usado para el lavado de células HeLa no se ajustó el pH, la esterilización se llevó a cabo con Millipore 0.22 μ m y se guardó a 4 °C.

AMORTIGUADO SALINO DE TRIS (Modificado)
(TBS o Tris-buffered saline)

NaCl	0.8%
KCl	0.038%
Tris base	0.3%

Se ajustó el pH a 7.4 con HCl 1 N.

SOLUCION DE ACRILAMIDA-BIS-ACRILAMIDA

Acrilamida (Bio-Rad)	30%
Bis-acrilamida (Bio-Rad)	0.8%
Glicerol	30%

Esta solución fue desionizada con amberlita (1%) durante 0.5 hrs en agitación y se filtró con Millipore 0.45 μ m. Se guardó a 4 °C. Se debe manejar con guantes. La acrilamida es neurotóxica.

AMORTIGUADOR DEL GEL DE CORRIDA 5X
(RGB o running gel buffer)

	Para 100 ml
Tris 2 M pH=8.8	93.7 ml
SDS 25%	2.0 ml
H ₂ O bidestilada	4.3 ml

AMORTIGUADOR DEL GEL CONCENTRADOR
(SGB o stacking gel buffer)

	Para 100 ml
Tris 2 M pH=6.8	50.0 ml
SDS 25%	3.2 ml
H ₂ O bidestilada	46.8 ml

AMORTIGUADOR DE MUESTRA
(BM o final sample buffer)

Tris 2 M pH=6.8	215 μ l
SDS 25%	500 μ l
2-mercaptoetanol	310 μ l
BPB (al 0.02% en glicerol)	100 μ l

30 μ l de BM fresco/100 μ l de muestra.

AMORTIGUADOR DE CORRIDA 10X

Tris Base	30.28 g
Glicina	144.1 g
SDS	10.0 g

Se aforó a 1 litro con agua.

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA

Trizma-Base	3.06 g
Glicina	14.41 g
Metanol	200.0 ml

Se aforó a 1 litro con agua. Se guardó a 4 °C.

AMORTIGUADOR DE LAVADO 2X (WB o washing buffer)

Tris 2 M pH=7.4	10.0 ml
NaCl	17.53 g
Tritón X-100	10.0 ml
SDS	4.0 g

Se aforó a 1 litro con agua.

AMORTIGUADOR "B"

Tris 2 M pH=7.9	650.0 μ l
EDTA 0.5 M	200.0 μ l

Se aforó a 50 ml con agua, se agregaron 5 ml de glicerol y se almacenó a 4 °C.

Al momento de utilizarse se agregaron:

DTT 1 M	1 μ l/ml
PMSF 200 mM	1 μ l/ml

DITRIOTRITOL

(DTT o dithiothreitol)

Se preparó una solución al 1 M. Se almacenó a -20 °C.

FLUORURO DE FENIL-METIL-SULFONILO

(PMSF o phenylmethyl-sulfonyl fluoride)

Se preparó una solución al 200 mM en etanol. Se guardó a -20 °C.

ISOPROPIL β -D-TIOGALACTOPIRANOSIDO

(IPTG)

Se preparó una solución al 1 M en agua bidestilada estéril. Se almacenó a -20 °C.

PERSULFATO DE AMONIO

(APS o ammonium persulphate)

Se preparó una solución al 10% en agua. Se almacenó a 4 °C.

SM
(Medio de almacenaje de fagos)
Para 100 ml

NaCl	0.58g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2g
Tris Cl 1 M (pH 7.5)	5.0ml
Gelatina 2†	0.01‡ [final]

Se autoclavó y se guardó a 4 °C.

MALTOSA

Maltosa	20.0‡
---------	-------

Se aforó con agua y se esterilizó por filtración. Se almacenó a 4 °C.

Nota: todas las soluciones, excepto los medios preparados a base de LB (los cuales se guardan a 4 °C) y las indicadas, se guardan a temperatura ambiente.

Para la preparación de todas las soluciones se utilizó agua bidestilada estéril.

Para mayor información, remitirse a Maniatis et al., 1982.

ANEXO 2

ANALISIS POR COMPUTADORA DE E6 Y E7 DE LOS HPV-16 Y HPV-18

I B I

INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGIES, INC.

Copyright 1982,83,84
by: Jim Pustell-----
DNA SEQUENCE TRANSLATION PROGRAM

Version 4.0

TRANSLATED SEQUENCE OF E6HPV16.

	10		20		30		40		50									
TAT	AAA	AGC	AGA	CAT	TTT	ATG	CAC	CAA	AAG	AGA	ACT	GCA	ATG	TTT	CAG	GAC	CCA	CAG
						Met	His	Gln	Lys	Arg	Thr	Ala	Met	Phe	Gln	Asp	Pro	Gln
	60		70		80		90		100		110							
GAG	CGA	CCC	AGA	AAG	TTA	CCA	CAG	TTA	TGC	ACA	GAG	CTG	CAA	ACA	ACT	ATA	CAT	GAT
Glu	Arg	Pro	Arg	Lys	Leu	Pro	Gln	Leu	Cys	Thr	Glu	Leu	Gln	Thr	Thr	Ile	His	Asp
	120		130		140		150		160		170							
ATA	ATA	TTA	GAA	TGT	GTG	TAC	TGC	AAG	CAA	CAG	TTA	CTG	CGA	CGT	GAG	GTA	TAT	GAC
Ile	Ile	Leu	Glu	Cys	Val	Tyr	Cys	Lys	Gln	Gln	Leu	Leu	Arg	Arg	Glu	Val	Tyr	Asp
	180		190		200		210		220									
TTT	GCT	TTT	CGG	GAT	TTA	TGC	ATA	GTA	TAT	AGA	GAT	GGG	AAT	CCA	TAT	GCT	GTA	TGT
Phe	Ala	Phe	Arg	Asp	Leu	Cys	Ile	Val	Tyr	Arg	Asp	Gly	Asn	Pro	Tyr	Ala	Val	Cys
	230		240		250		260		270		280							
GAT	AAA	TGT	TTA	AAG	TTT	TAT	TCT	AAA	ATT	AGT	GAG	TAT	AGA	CAT	TAT	TGT	TAT	AGT
Asp	Lys	Cys	Leu	Lys	Phe	Tyr	Ser	Lys	Ile	Ser	Glu	Tyr	Arg	His	Tyr	Cys	Tyr	Ser
	290		300		310		320		330		340							
TTG	TAT	GGA	ACA	ACA	TTA	GAA	CAG	CAA	TAC	AAC	AAA	CCG	TTG	TGT	GAT	TTG	TTA	ATT
Leu	Tyr	Gly	Thr	Thr	Leu	Glu	Gln	Gln	Tyr	Asn	Lys	Pro	Leu	Cys	Asp	Leu	Leu	Ile
	350		360		370		380		390									
AGG	TGT	ATT	AAC	TGT	CAA	AAG	CCA	CTG	TGT	CCT	GAA	GAA	AAG	CAA	AGA	CAT	CTG	GAC
Arg	Cys	Ile	Asn	Cys	Gln	Lys	Pro	Leu	Cys	Pro	Glu	Glu	Lys	Gln	Arg	His	Leu	Asp
	400		410		420		430		440		450							
AAA	AAG	CAA	AGA	TTC	CAT	AAT	ATA	AGG	GGT	CGG	TGG	ACC	GGT	CGA	TGT	ATG	TCT	TGT
Lys	Lys	Gln	Arg	Phe	His	Asn	Ile	Arg	Gly	Arg	Trp	Thr	Gly	Arg	Cys	Met	Ser	Cys
	460		470		480		490											
TGC	AGA	TCA	TCA	AGA	ACA	CGT	AGA	GAA	ACC	CAG	CTG	TAA						
Cys	Arg	Ser	Ser	Arg	Thr	Arg	Arg	Glu	Thr	Gln	Leu	---						

Table Of Codon Usage In E6HPV16.
As Translated Above

Number of identified codons= 158
Number of unidentified codons= 0
Calculated Molecular Weight= 19185.90

TTT Phe	4	2.5%	TCT Ser	2	1.3%	TAT Tyr	8	5.1%	TGT Cys	10	6.3%
TTC Phe	1	.6%	TCC Ser	0	.0%	TAC Tyr	2	1.3%	TGC Cys	4	2.5%
TTA Leu	8	5.1%	TCA Ser	2	1.3%	TAA ---	1	--	TGA ---	0	--
TTG Leu	3	1.9%	TCG Ser	0	.0%	TAG ---	0	--	TGG Trp	1	.6%
CTT Leu	0	.0%	CCT Pro	1	.6%	CAT His	4	2.5%	CGT Arg	2	1.3%
CTC Leu	0	.0%	CCC Pro	1	.6%	CAC His	1	.6%	CGC Arg	0	.0%
CTA Leu	0	.0%	CCA Pro	4	2.5%	CAA Gln	7	4.4%	CGA Arg	3	1.9%
CTG Leu	5	3.2%	CCG Pro	1	.6%	CAG Gln	6	3.8%	CGG Arg	2	1.3%
ATT Ile	3	1.9%	ACT Thr	2	1.3%	AAT Asn	2	1.3%	AGT Ser	2	1.3%
ATC Ile	0	.0%	ACC Thr	2	1.3%	AAC Asn	2	1.3%	AGC Ser	0	.0%
ATA Ile	5	3.2%	ACA Thr	5	3.2%	AAA Lys	4	2.5%	AGA Arg	9	5.7%
ATG Met	3	1.9%	ACG Thr	0	.0%	AAG Lys	7	4.4%	AGG Arg	2	1.3%
GTT Val	0	.0%	GCT Ala	2	1.3%	GAT Asp	5	3.2%	GGT Gly	2	1.3%
GTC Val	0	.0%	GCC Ala	0	.0%	GAC Asp	3	1.9%	GGC Gly	0	.0%
GTA Val	3	1.9%	GCA Ala	1	.6%	GAA Glu	5	3.2%	GGA Gly	1	.6%
GTG Val	1	.6%	GCG Ala	0	.0%	GAG Glu	4	2.5%	GGG Gly	1	.6%

Translation begun with base no. 19
(first ATG after base no. 0)
Translation stopped at termination codon (base no. 493)
Sequence printed from base no. 1 to base no. 495
Sequence numbered beginning with base no. 1

INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGIES, INC.

Copyright 1982,83,84
by: Jim Pustell

DNA SEQUENCE TRANSLATION PROGRAM

Version 4.0

TRANSLATED SEQUENCE OF E6HPV16.

```

      10      20      30      40      50
      *      *      *      *      *
ATG GCG CGC TTT GAG GAT CCA ACA CGG CGA CCC TAC AAG CTA CCT GAT CTG TGC ACG
Met Ala Arg Phe Glu Asp Pro Thr Arg Arg Pro Tyr Lys Leu Pro Asp Leu Cys Thr

      60      70      80      90      100     110
      *      *      *      *      *
GAA CTG AAC ACT TCA CTG CAA GAC ATA GAA ATA ACC TGT GTA TAT TGC AAG ACA GTA
Glu Leu Asn Thr Ser Leu Gln Asp Ile Glu Ile Thr Cys Val Tyr Cys Lys Thr Val

      120     130     140     150     160     170
      *      *      *      *      *
TTG GAA CTT ACA GAG GTA TTT GAA TTT GCA TTT AAA GAT TTA TTT GTG GTG TAT AGA
Leu Glu Leu Thr Glu Val Phe Glu Phe Ala Phe Lys Asp Leu Phe Val Val Tyr Arg

      180     190     200     210     220
      *      *      *      *      *
GAC AGT ATA CCG CAT GCT GCA TGC CAT AAA TGT ATA GAT TTT TAT TCT AGA ATT AGA
Asp Ser Ile Pro His Ala Ala Cys His Lys Cys Ile Asp Phe Tyr Ser Arg Ile Arg

      230     240     250     260     270     280
      *      *      *      *      *
GAA TTA AGA CAT TAT TCA GAC TCT GTG TAT GGA GAC ACA TTG GAA AAA CTA ACT AAC
Glu Leu Arg His Tyr Ser Asp Ser Val Tyr Gly Asp Thr Leu Glu Lys Leu Thr Asn

      290     300     310     320     330     340
      *      *      *      *      *
ACT GGG TTA TAC AAT TTA TTA ATA AGG TGC CTG CGG TGC CAG AAA CCG TTG AAT CCA
Thr Gly Leu Tyr Asn Leu Leu Ile Arg Cys Leu Arg Cys Gln Lys Pro Leu Asn Pro

      350     360     370     380     390
      *      *      *      *      *
GCA GAA AAA CTT AGA CAC CTT AAT GAA AAA CGA CGA TTT CAC AAC ATA GCT GGG CAC
Ala Glu Lys Leu Arg His Leu Asn Glu Lys Arg Arg Phe His Asn Ile Ala Gly His

      400     410     420     430     440     450
      *      *      *      *      *
TAT AGA GGC CAG TGC CAT TCG TGC TGC AAC CGA GCA CGA CAG GAA CGA CTC CAA CGA
Tyr Arg Gly Gln Cys His Ser Cys Cys Asn Arg Ala Arg Gln Glu Arg Leu Gln Arg

      460     470
      *      *
CGC AGA GAA ACA CAA GTA TAA
Arg Arg Glu Thr Gln Val ---

```

Table Of Codon Usage In E6HPV18.
As Translated Above

Number of identified codons= 158
Number of unidentified codons= 0
Calculated Molecular Weight= 18870.37

TTT Phe	7	4.4%	TCT Ser	2	1.3%	TAT Tyr	6	3.8%	TGT Cys	2	1.3%
TTC Phe	0	.0%	TCC Ser	0	.0%	TAC Tyr	2	1.3%	TGC Cys	8	5.1%
TTA Leu	5	3.2%	TCA Ser	2	1.3%	TAA ---	1	--	TGA ---	0	--
TTG Leu	3	1.9%	TCG Ser	1	.6%	TAG ---	0	--	TGG Trp	0	.0%
CTT Leu	3	1.9%	CCT Pro	1	.6%	CAT His	4	2.5%	CGT Arg	0	.0%
CTC Leu	1	.6%	CCC Pro	1	.6%	CAC His	3	1.9%	CGC Arg	2	1.3%
CTA Leu	2	1.3%	CCA Pro	2	1.3%	CAA Gln	3	1.9%	CGA Arg	7	4.4%
CTG Leu	4	2.5%	CCG Pro	2	1.3%	CAG Gln	3	1.9%	CGG Arg	2	1.3%
ATT Ile	1	.6%	ACT Thr	3	1.9%	AAT Asn	3	1.9%	AGT Ser	1	.6%
ATC Ile	0	.0%	ACC Thr	1	.6%	AAC Asn	4	2.5%	AGC Ser	0	.0%
ATA Ile	6	3.8%	ACA Thr	5	3.2%	AAA Lys	6	3.8%	AGA Arg	7	4.4%
ATG Met	1	.6%	ACG Thr	1	.6%	AAG Lys	2	1.3%	AGG Arg	1	.6%
GTT Val	0	.0%	GCT Ala	2	1.3%	GAT Asp	4	2.5%	GGT Gly	0	.0%
GTC Val	0	.0%	GCC Ala	0	.0%	GAC Asp	4	2.5%	GGC Gly	1	.6%
GTA Val	4	2.5%	GCA Ala	4	2.5%	GAA Glu	10	6.3%	GGA Gly	1	.6%
GTG Val	3	1.9%	GCG Ala	1	.6%	GAG Glu	2	1.3%	GGG Gly	2	1.3%

Translation begun with base no. 1
(first ATG after base no. 0)
Translated to 3' end
Sequence printed from base no. 1 to base no. 477
Sequence numbered beginning with base no. 1

Análisis realizado en base a la secuencia nucleotídica publicada
por Seedorf et al., 1987.

INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGIES, INC.

Copyright 1982,83,84
by: Jim Pustell

DNA SEQUENCE TRANSLATION PROGRAM

Version 4.0

TRANSLATED SEQUENCE OF E7HPV16.

```

      10           20           30           40           50
AGA AAC CCA CCA GTA ATC ATG CAT GGA GAT ACA CCT ACA TTG CAT GAA TAT ATG TTA
      Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu

      60           70           80           90           100          110
GAT TTG CAA CCA GAG ACA ACT GAT CTC TAC TGT TAT GAG CAA ITA AAT GAC AGC TCA
Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser

      120          130          140          150          160          170
GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT CCA GCT GGA CAA GCA GAA CCG GAC AGA GCC CAT
Glu Glu Glu Asp Glu Ile Asp Gly Pro Ala Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His

      180          190          200          210          220
TAC AAT ATT GTA ACC TTT TGT TGC AAG TGT GAC TCT ACG CTT CGG TTG TGC GTA CAA
Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln

      230          240          250          260          270          280
AGC ACA CAC GTA GAC ATT CGT ACT TTG GAA GAC CTG TTA ATG GGC ACA CTA GGA ATT
Ser Thr His Val Asp Ile Arg Thr Leu Glu Asp Leu Leu Met Gly Thr Leu Gly Ile

      290          300          310
GTG TGC CCC ATC TGT TCT CAG AAA CCA TAA
Val Cys Pro Ile Cys Ser Gln Lys Pro ---
  
```

Table Of Codon Usage In E7HPV16.
As Translated Above

Number of identified codons= 98
Number of unidentified codons= 0
Calculated Molecular Weight= 11021.64

TTT Phe	1	1.0%	TCT Ser	2	2.0%	TAT Tyr	2	2.0%	TGT Cys	4	4.1%
TTC Phe	0	.0%	TCC Ser	0	.0%	TAC Tyr	2	2.0%	TGC Cys	3	3.1%
TTA Leu	3	3.1%	TCA Ser	1	1.0%	TAA ---	1	--	TGA ---	0	--
TTG Leu	4	4.1%	TCG Ser	0	.0%	TAG ---	0	--	TGG Trp	0	.0%

CTT Leu	1	1.0%	CCT Pro	1	1.0%	CAT His	3	3.1%	CGT Arg	1	1.0%
CTC Leu	1	1.0%	CCC Pro	1	1.0%	CAC His	1	1.0%	CGC Arg	0	.0%
CTA Leu	1	1.0%	CCA Pro	3	3.1%	CAA Gln	4	4.1%	CGA Arg	0	.0%
CTG Leu	1	1.0%	CCG Pro	1	1.0%	CAG Gln	1	1.0%	CGG Arg	1	1.0%
ATT Ile	3	3.1%	ACT Thr	2	2.0%	AAT Asn	2	2.0%	AGT Ser	0	.0%
ATC Ile	1	1.0%	ACC Thr	1	1.0%	AAC Asn	0	.0%	AGC Ser	2	2.0%
ATA Ile	1	1.0%	ACA Thr	5	5.1%	AAA Lys	1	1.0%	AGA Arg	1	1.0%
ATG Met	3	3.1%	ACG Thr	1	1.0%	AAG Lys	1	1.0%	AGG Arg	0	.0%
GTT Val	0	.0%	GCT Ala	1	1.0%	GAT Asp	5	5.1%	GGT Gly	1	1.0%
GTC Val	0	.0%	GCC Ala	1	1.0%	GAC Asp	5	5.1%	GGC Gly	1	1.0%
GTA Val	3	3.1%	GCA Ala	1	1.0%	GAA Glu	4	4.1%	GGA Gly	3	3.1%
GTG Val	1	1.0%	GCG Ala	0	.0%	GAG Glu	5	5.1%	GGG Gly	0	.0%

Translation begun with base no. 19
 (first ATG after base no. 0)
 Translation stopped at termination codon (base no. 313)
 Sequence printed from base no. 1 to base no. 315
 Sequence numbered beginning with base no. 1

Análisis realizado en base a la secuencia nucleotídica publicada
 por Seedorf et al., 1985.



INTERNATIONAL BIOTECHNOLOGIES, INC.

Copyright 1982, 83, 84
by: Jim Pustell

DNA SEQUENCE TRANSLATION PROGRAM

Version 4.0

TRANSLATED SEQUENCE OF E7HPV18.

```

      10           20           30           40           50
ATG CAT GGA CCT AAG GCA ACA TTG CAA GAC ATT GTA TTG CAT TTA GAG CCC CAA AAT
Met His Gly Pro Lys Ala Thr Leu Gln Asp Ile Val Leu His Leu Glu Pro Gln Asn

      60           70           80           90           100          110
GAA ATT CCG GTT GAC CTT CTA TGT CAC GAG CAA TTA AGC GAC TCA GAG GAA GAA AAC
Glu Ile Pro Val Asp Leu Leu Cys His Glu Gln Leu Ser Asp Ser Glu Glu Glu Asn

      120          130          140          150          160          170
GAT GAA ATA GAT GGA GTT AAT CAT CAA CAT TTA CCA GCC CGA CGA GCC GAA CCA CAA
Asp Glu Ile Asp Gly Val Asn His Gln His Leu Pro Ala Arg Arg Ala Glu Pro Gln

      180          190          200          210          220
CGT CAC ACA ATG TTG TGT ATG TGT TGT AAG TGT GAA GCC AGA ATT GAG CTA GTA GTA
Arg His Thr Met Leu Cys Met Cys Cys Lys Cys Glu Ala Arg Ile Glu Leu Val Val

      230          240          250          260          270          280
GAA AGC TCA GCA GAC GAC CTT CGA GCA TTC CAG CAG CTG TTT CTG AAC ACC CTG TCC
Glu Ser Ser Ala Asp Asp Leu Arg Ala Phe Gln Gln Leu Phe Leu Asn Thr Leu Ser

      290          300          310
TTT GTG TGT CCG TGG TGT GCA TCC CAG CAG TAA
Phe Val Cys Pro Trp Cys Ala Ser Gln Gln ---
  
```

Table Of Codon Usage In E7HPV18.
As Translated Above

Number of identified codons= 105
Number of unidentified codons= 0
Calculated Molecular Weight= 11994.87

TTT Phe	2	1.9%	TCT Ser	0	.0%	TAT Tyr	0	.0%	TGT Cys	7	6.7%
TTC Phe	1	1.0%	TCC Ser	2	1.9%	TAC Tyr	0	.0%	TGC Cys	0	.0%
TTA Leu	3	2.9%	TCA Ser	2	1.9%	TAA ---	1	--	TGA ---	0	--
TTG Leu	3	2.9%	TCG Ser	0	.0%	TAG ---	0	--	TGG Trp	1	1.0%

CTT Leu	2	1.9%	CCT Pro	1	1.0%	CAT His	4	3.8%	CGT Arg	1	1.0%
CTC Leu	0	.0%	CCC Pro	1	1.0%	CAC His	2	1.9%	CGC Arg	0	.0%
CTA Leu	2	1.9%	CCA Pro	2	1.9%	CAA Gln	5	4.8%	CGA Arg	3	2.9%
CTG Leu	3	2.9%	CCG Pro	2	1.9%	CAG Gln	4	3.8%	CGG Arg	0	.0%
ATT Ile	3	2.9%	ACT Thr	0	.0%	AAT Asn	2	1.9%	AGT Ser	0	.0%
ATC Ile	0	.0%	ACC Thr	1	1.0%	AAC Asn	2	1.9%	AGC Ser	2	1.9%
ATA Ile	1	1.0%	ACA Thr	2	1.9%	AAA Lys	0	.0%	AGA Arg	1	1.0%
ATG Met	3	2.9%	ACG Thr	0	.0%	AAG Lys	2	1.9%	AGG Arg	0	.0%
GTT Val	2	1.9%	GCT Ala	0	.0%	GAT Asp	2	1.9%	GGT Gly	0	.0%
GTC Val	0	.0%	GCC Ala	3	2.9%	GAC Asp	5	4.8%	GGC Gly	0	.0%
GTA Val	3	2.9%	GCA Ala	4	3.8%	GAA Glu	7	6.7%	GGA Gly	2	1.9%
GTG Val	1	1.0%	GCG Ala	0	.0%	GAG Glu	4	3.8%	GGG Gly	0	.0%

Translation begun with base no. 1
 (first ATG after base no. 0)
 Translation stopped at termination codon (base no. 316)
 Sequence printed from base no. 1 to base no. 318
 Sequence numbered beginning with base no. 1

Análisis realizado en base a la secuencia nucleotídica publicada
 por Seedorf et al., 1987.

GLOSARIO

Anticuerpo. Es una proteína (inmunoglobulina), producida por linfocitos B, que reconoce y se une específicamente al epítopo particular de un antígeno.

Cáncer. (Del lat. cancer, cangrejo.) Término general que en el humano sirve para designar a más de 200 enfermedades que pueden presentarse prácticamente en todos los órganos y tejidos del cuerpo, y que se caracterizan por crecimiento anormal, incontrolado y diseminación de las células cancerosas.

Carcinógeno. Cualquier factor que resulte en la transformación de una célula normal a una célula cancerosa.

Carcinoma. (Del lat. carcinoma, y éste del gr. carcinoma.) Tumor maligno que se desarrolla a partir de células epiteliales.

Carcinoma *in situ*. Un estado en el desarrollo del cáncer, cuando éste está todavía confinado al tejido en el cual comenzó.

Célula cancerosa. Los cambios que ocurren en una célula, cuando ésta se convierte en tumorigénica, se pueden dividir en tres: inmortalización, transformación y metástasis (ver cada término). Una célula cancerosa tiende a usar varias veces el requerimiento de glucosa con respecto a una célula normal. También produce ácido láctico bajo condiciones aeróbicas (glucólisis aeróbica). Esto pone una carga sobre el hígado, el cual debe usar ATP para liberarse del lactato. Una característica notable de las células cancerosas en cultivo es la pérdida de inhibición por contacto.

Codón ambar. Es el triplete AUG, uno de los tres codones sin sentido que causan la terminación de la síntesis de proteínas.

Displasia. Describe la presencia de células anormales. La displasia cervical puede ser clasificada como leve, moderada o severa.

Empalme. (Ingl. "splicing".) Describe la remoción de intrones y la unión de exones en RNA.

Fago o bacteriófago. Virus bacteriano.

Inmortalización. Describe la propiedad de crecimiento indefinido (sin que necesariamente ocurra algún otro cambio en el fenotipo).

Leucemia. (Del gr. leucos, blanco, y aima, sangre.) Cáncer del tejido hematopoyético; se caracteriza por la sobreproducción de glóbulos blancos inmaduros.

Marco de lectura abierta. Contiene una serie de tripletes que codifican para aminoácidos; la secuencia es (potencialmente) traducida en proteína.

Metástasis. (Del griego metástasis, cambio de lugar.) En esta etapa la célula tumorigénica invade el tejido normal, moviéndose fuera del tejido de origen generalmente vía sanguínea o linfática, y esparciéndose a otros lugares del cuerpo, para formar colonias de nuevos tumores malignos, frecuentemente por pegamiento al endotelio de un capilar.

Mutación ambar. Describe cualquier cambio en el DNA que crea un codón ambar en un sitio previamente ocupado por un codón que representaba un aminoácido en una proteína.

Neoplasia. (De neo- y el gr. plasis, formación.) Formación, en alguna parte del cuerpo, de un tejido, cuyos elementos sustituyen a los de los tejidos normales.

Neoplasia intraepitelial cervical (NIC). Lesión premaligna del cáncer cervico-uterino. Se divide en NIC I, II y III.

Oncogen. Locus genético (puede ser de un virus tumorigénico o de una célula) involucrado en la conversión de una célula normal a una cancerosa. Los genes celulares con el potencial para convertirse en oncogenes son llamados proto-oncogenes.

Papiloma. (De papila y -oma). Variedad de epiteloma caracterizado por el aumento de volumen en las papilas de la piel o de las mucosas, con induración de la dermis subyacente.

Picnosis. Reducción del núcleo o del protoplasma de una célula; esta reducción suele preceder por lo general a degeneración y fragmentación celular.

Plásmido. Es un DNA circular extracromosomal de autorreplicación autónoma.

Pleomorfismo. Multiplicidad de formas.

Potenciador. (Ingl. "enhancer".) Elemento que actúa en cis y que incrementa la transcripción de algunos promotores eucariontes; puede funcionar en cualquier orientación y arriba o abajo con respecto al promotor.

Promotor. Región de DNA involucrada en la unión de RNA polimerasa para el inicio de la transcripción.

Sarcoma. (Del lat. sarcoma, y éste del gr. sárcoma, aumento de carne.) Tumor maligno que surge en el tejido conectivo o en el muscular.

Supresor ámbar. Son genes mutantes que codifican para tRNAs, cuyos anticodones han sido alterados para poder responder a codones UAG.

Tumor. (Del lat. tumor.) Un hinchazón o expansión que se forma anormalmente en alguna parte del cuerpo; la masa anormal, que puede ser benigna o maligna, no tiene una función útil.

Tumor benigno. Un hinchazón o crecimiento anormal que no es un cáncer y generalmente no es dañino.

Tumor maligno. Un tumor formado de células cancerosas. Estos tumores continúan creciendo e invaden otros tejidos; las células se pueden escapar y crecer en otra parte del cuerpo.

Transformación. 1. En esta etapa la célula tumorigénica pierde las reglas de crecimiento; por ejemplo, las células transformadas pueden ser independientes de factores generalmente necesitados por células normales. 2. de bacteria. Describe la incorporación de un DNA que se desea.