

38
21



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA



**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**

**DETECCION DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO
EN LINEAS CELULARES Y EVALUACION DE LA
ACTIVIDAD ANTIVIRAL DE NUEVAS MOLECULAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :

MIRELLE VANESSA GONZALEZ COVARRUBIAS



MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente

Prof. Quintero Ruíz Angelina

Vocal

Prof. Naranjo Rodríguez Elia Brosla

Secretario

Prof. Hernández Luis Francisco

1er. Suplente

Prof. Giral Barnés Carmen

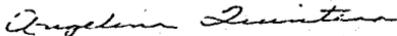
2do. Suplente

Prof. Camacho Arroyo Ignacio

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA

Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Biología.
Facultad de Química, U.N.A.M.

Asesor del Tema:



Dra. Angelina Quintero Ruíz.

Sustentante:



Mirelle Vanessa González Covarrubias.

DEDICATORIAS

- ❖ *A mis padres: Jaime y Lilia porque gracias a ustedes he llegado a este gran escalón de mi vida, por su amor, apoyo, entusiasmo y confianza, que hacen que me supere día con día. Gracias por motivarme siempre. Los quiero muchísimo.*
- ❖ *A mis hermanos: Tania, Jaime, Rodrigo y Aletia porque complementan mi vida, y hemos pasado increíbles momentos.*
- ❖ *A mis abuelos Evangelina, Ausencio, Natividad y Luis por ser un ejemplo a seguir.*
- ❖ *A toda mi familia que siempre ha estado cerca y que son parte de mis logros.*
- ❖ *A Jose Ramos por su apoyo, cariño y paciencia, por estar siempre cerca, en las buenas y en las malas.*
- ❖ *A mis amigos que siempre tuvieron un momento para compartir y me enseñaron el verdadero significado de la amistad. Gracias: Ma. Elena B., Patricia H., Hugo H., Beatriz D., Paula G., Karla J., Sonia T., Patricia P.*
- ❖ *A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular con quienes compartí muchas horas de trabajo, pero también buenos momentos.*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco especialmente a la Dra. Angelina Quintero R. por su tiempo y dedicación, para la realización de este trabajo. Gracias, porque supo encausarme hacia esta área de la bioquímica y por compartir sus conocimientos y experiencia.

Agradezco a los integrantes del jurado:

Dra. Angelina Quintero R.

Dra. Elia Bresla Naranjo.

Dr. Francisco Hernández L.

Dra. Carmen Giral B.

Dr. Ignacio Camacho A.

Por sus valiosas sugerencias y comentarios para la culminación de este trabajo.

Agradezco a los Drs. Angel Guzmán y Eduardo Díaz, Benny Weiss y Rosalba Rangel, por su interés y el material proporcionado para este estudio.

Agradezco al Dr. M. Carbón, Dr. A García C., Dra. Marcela Terrazas, QFB José Solano, M en C. Julia Segura y QFB Abelardo Solano por sus innumerables intervenciones y asesorías durante el trabajo experimental de esta investigación.

A todos; GRACIAS.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. JUSTIFICACION	3
III. OBJETIVOS	4
IV. HIPOTESIS	5
V. MARCO TEORICO	
• TEORIA DEL DESARROLLO DEL CANCER	6
• CANCER CERVICO UTERINO	
• Patología	15
• Clasificación	16
• Diagnóstico	17
• Etiología	18
• Tratamiento	18
• VIRUS DE PAPILOMA HUMANO	
• Generalidades	20
• Eventos Iniciales de la Infección	21
• Clasificación	22
• Mecanismos Moleculares de Inducción de Cáncer	26
• Etiología en Cáncer de Cérvix	27
• Virus de Papiloma en Humanos	28
• Enfermedades Relacionadas	29
• Organización Genómica	31
• Virus de Papiloma y Cáncer de Cérvix	36
• Funciones Transformantes del Virus de Papiloma	37
• Oncoproteína E6	39
• Oncoproteína E7	40
• VPH y el Supresor Tumoral p53	41
• Estado Físico del VPH en Cáncer de Cérvix	44
• Respuesta Inmune de los VPH	49
• Diagnóstico	52
• Tratamiento	53
• Perspectivas de Vacunación	57
• QUIMIOTERAPIA	
• Agentes en el Tratamiento de C. Cérvix	59
• Agentes Antivirales	62
• Mecanismo de Acción	63
VI. NUEVAS MOLECULAS DISEÑADAS COMO ANTIVIRALES	65

VII. METODOLOGIA

• Material para el cultivo de líneas celulares	68
• Material para la Extracción de DNA	68
• Material para Electroforesis	69
• Material para Extracción e Hibridación de RNA	69
• Líneas Celulares	70
• Secuencia de la Metodología	72
• Cultivo de líneas celulares	73
• Extracción de DNA	75
• Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	77
• Análisis de los Productos de Amplificación	80
• Procedimiento para Evaluar la Actividad Biológica de los Nuevos Compuestos	81
• Extracción de RNA	82
• Preparación de la Sonda	82
• Hibridación Northern Blot	83

VIII. RESULTADOS

• Detección del Virus de Papiloma Fig.1	88
• Tipificación del Virus de Papiloma Fig.2	89
• Observaciones Microscópicas de las células tratadas con los nuevos compuestos.	90
• Observaciones en la línea CALO	90
• Observaciones en la línea VIPA	92
• Observaciones en la línea INBL	94
• Efecto de los nuevos compuestos sobre la replicación del gen L1 • Efectos en la línea CALO Fig. 4	98
• Efectos en la línea VIPA Fig. 5	99
• Efectos en la línea INBL Fig.6	100
• Evaluación de la posible actividad de los nuevos compuestos sobre la transcripción viral	101
• RNA de las líneas tratadas con los nuevos compuestos Fig. 7	102
• Efecto sobre la transcripción del gen L1 Fig. 8	102

IX.DISCUSION	103
--------------------	-----

X.CONCLUSIONES	109
----------------------	-----

• APENDICE I: Abreviaturas	110
• APENDICE II: Glosario	111
• Bibliografía	112

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad en la cual los mecanismos celulares encargados de regular la proliferación están fuera de control, es decir las células presentan un desorden en el control del crecimiento y diferenciación celular. Es una enfermedad multifactorial, es decir que puede tener muchas causas como dieta, herencia, hábitos de higiene, nivel socioeconómico, medio ambiente y efectos de compuestos químicos.

El desarrollo de la enfermedad implica varias etapas, existe un modelo que sugiere como ocurre la progresión tumoral. Es el modelo de la evolución clonal de tumores y sugiere que: A partir de una célula normal la célula hija hereda o adquiere una mutación promotora del cáncer, transmite el defecto a sus descendientes y a todas las generaciones subsiguientes. En algún momento una de las descendientes adquiere una segunda mutación y otra descendiente de ésta adquiere una tercera y así sucesivamente. Por último una célula acumula las mutaciones que le permiten atravesar el umbral del cáncer.

Se ha planteado la pregunta sobre si el cáncer es una enfermedad del ciclo celular. Ya que la mutación en los genes del ciclo celular es la característica genética más común de las células tumorales. También es muy común que las células tumorales presenten mutaciones en los genes que codifican para supresores tumorales.

El cáncer es la segunda causa de morbilidad y mortalidad, sólo después de las enfermedades del corazón. De 1990 a 1993, 630 instituciones públicas y privadas de salud, notificaron 180 mil nuevos casos de cáncer en México.

El cáncer de cérvix es la cuarta causa de muerte por cáncer en países industrializados, mientras que en países en vías de desarrollo ocupa el 2º lugar. El Instituto Nacional de Cancerología (INCan) ha declarado que es la primera causa de muerte por cáncer en México. En nuestro país muere una mujer cada dos horas a causa de esta enfermedad.

El cáncer de cérvix es una enfermedad que se presenta con mayor incidencia entre los 35 - 55 años. Se presenta con mayor frecuencia en países en vías de desarrollo, en mujeres de niveles socioeconómicos bajos y en mujeres con múltiples parejas sexuales.

El tratamiento de este tipo de cáncer se lleva a cabo mediante radioterapia y cirugía, complementando a veces con quimioterapia. Sin embargo la reincidencia es elevada. Al parecer el Virus de Papiloma Humano (VPH) (virus de la familia *Papoviridae*) es el principal factor etiológico de esta enfermedad, pues se le encuentra asociado en un 90% de los casos a los tumores de cáncer de cérvix.

Existen pocos fármacos como la podofilina y el 5-FU destinados a combatir el VPH o las lesiones que causa. Los cuales solo actúan si la lesión es leve y temprana.

II. JUSTIFICACION

Debido a que el cáncer cérvico uterino es un grave problema de salud en países en vías de desarrollo son necesarias las investigaciones de este tipo de cáncer a nivel molecular. La caracterización de líneas celulares provenientes de tumores de cáncer de cérvix es una forma *in vitro* de estudiar esta enfermedad con el fin de conocer las bases moleculares ya que de esta forma se podrán diseñar programas de prevención o establecer una terapia más eficaz.

La infección por VPH generalmente predice y precede a la incidencia de neoplasia cervical, por lo cual es importante el estudio del cáncer de cérvix y su relación con este virus. Dada la complejidad del cultivo de virus una alternativa para su estudio es a través de líneas celulares tumorales infectadas con el VPH. Para esto es indispensable la caracterización de líneas celulares derivadas de pacientes con cáncer cérvico uterino.

Ya que el VPH es el principal factor etiológico, y existen pocos fármacos para su tratamiento, resulta relevante la evaluación de la posible actividad antiviral de nuevas moléculas.

III. OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES:

1. Caracterización de la línea celular de cáncer cérvico uterino VIPA.
2. Detección de la actividad biológica de nuevas moléculas diseñadas como compuestos antivirales.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Detección de la presencia del Virus de Papiloma Humano en la línea celular de cáncer de cérvix, VIPA.
2. Tipificación del Virus de Papiloma Humano encontrado.
3. Evaluación de la posible actividad antiviral de cinco nuevos compuestos.

IV. HIPOTESIS

- **VIPA es una línea celular obtenida de un tumor de una paciente mexicana con cáncer de cérvix. Ya que la mayoría de los tumores de cérvix contienen Virus de Papiloma Humano, es posible que la línea celular VIPA presente Virus de Papiloma Humano.**
- **Dado que las nuevas moléculas fueron diseñadas como posibles antivirales es posible que presenten alguna actividad contra el Virus de Papiloma Humano.**

V. MARCO TEORICO

TEORIA DE DESARROLLO DEL CANCER

Los 30 trillones de células que conforman un organismo saludable, viven en sistemas complejos e interdependientes, regulando la proliferación entre ellos. Esta continua colaboración asegura que cada tejido mantenga su tamaño y las características apropiadas para las necesidades del cuerpo (Weinberg Robert A 1996).

Las células cancerosas se vuelven sordas a los controles normales de proliferación y siguen sus propias señales. Poseen la insidiosa propiedad de migrar a partir de los sitios donde se originan, invadiendo tejidos cercanos y formando masas distantes. Los tumores constituidos de estas células malignas, son letales cuando interfieren con órganos y tejidos que son necesarios para la supervivencia de la totalidad del organismo.

Las células tumorales provienen de un ancestro común, generalmente antes de que un tumor se vuelva apreciable, (décadas antes) ha comenzado un programa de reproducción inapropiada que se origina a lo largo de mutaciones acumuladas.

Las mutaciones en un gen pueden alterar a la célula cambiando las cantidades o las actividades de las proteínas. Dos clases de genes juegan el papel principal en el desarrollo del cáncer. En un estado normal dirigen el ciclo de vida de la célula; la secuencia de eventos por los cuales una célula se divide y crece. Y por otro lado los proto-oncogenes favorecen ese crecimiento, mientras que los supresores tumorales lo inhiben (Weinberg Robert A 1996).

Cuando los proto oncogenes están mutados pueden convertirse en oncogenes carcinógenos que conducen a multiplicación excesiva. Las mutaciones hacen que los proto-oncogenes produzcan en exceso la proteína para la cual codifican la cual estimula la proliferación. Por otro lado los supresores tumorales contribuyen al cáncer cuando son inactivados por mutaciones, el resultado de la pérdida de esta funcionalidad conduce a que la célula carezca de eventos cruciales que impiden el crecimiento (Webster K. Cavenee 1995).

En un tumor canceroso en desarrollo se presentan mutaciones en más de media docena de genes que controlan el crecimiento celular. Claro que también pueden participar otra clase de genes para propiciar la malignidad.

SEÑALES DEL SISTEMA

Un tumor está fuera de control cuando una mutación en alguno de sus proto-oncogenes crea una ruta de estimulación del crecimiento, manteniéndola continuamente activa. Esta célula puede afectar a las demás si libera factores de crecimiento (Webster K. Cavenee 1995).

Cuando un factor de crecimiento llega al receptor traduce la señal de proliferación a las proteínas del citoplasma, estas proteínas a su vez emiten estímulos a otras proteínas y la cadena termina en el núcleo. En el núcleo los factores de transcripción responden activando un grupo de genes responsables de llevar a la célula a través de su ciclo de crecimiento.

Algunos oncogenes obligan a la célula a una sobreproducción de factores de crecimiento, por ejemplo en el caso de sarcomas y gliomas existen grandes cantidades del factor de crecimiento liberado de plaquetas, otros tipos de cáncer secretan un exceso factor de crecimiento transformante alfa. Estos factores actúan en células cercanas, pero también pueden afectar a la célula que la produjo.

También se han identificado versiones oncogénicas de receptores, los cuales liberan una gran cantidad de señales proliferativas hacia el citoplasma de la célula aun cuando no estén presentes factores de crecimiento un ejemplo es el receptor erb-B2 en cáncer de mama.

Otros oncogenes afectan partes de la cascada de transducción de señales, el mejor ejemplo es la familia de oncogenes ras. En condiciones normales las proteínas del gen ras transmiten señales estimuladoras provenientes de los factores de crecimiento. Cuando el gen ras está mutado las proteínas resultantes transmiten continuamente señales estimuladoras del crecimiento, aun en ausencia de factores de crecimiento. Las proteínas hiperactivas de ras se encuentran en una cuarta parte de todos los tumores humanos (Weinberg Robert A 1996).

Otro grupo de oncogenes es la familia *myc*, que alteran la actividad de los factores de transcripción en el núcleo. Las células normales crean proteínas de *myc* solo cuando han sido estimuladas con factores de transcripción en la superficie celular. Las proteínas de *myc* activan genes que obligan a la célula a continuar creciendo, pero en estados patológicos, los niveles de *myc* se mantienen constantemente altos incluso en la ausencia de factores de crecimiento (Weinberg Robert A 1996).

Actualmente las compañías farmacéuticas centran sus estudios en el ataque a los factores de crecimiento malignos. Un intento al respecto ha desarrollado compuestos que bloquean la síntesis de proteínas aberrantes del grupo Ras.

LOS SUPRESORES TUMORALES DEJAN DE FUNCIONAR

Para que las células se vuelvan malignas, deben hacer algo más que sobreestimar la maquinaria que promueve el crecimiento, también deben idear medios para evadir o eliminar las señales que emiten las células vecinas. Las células reciben mensajes inhibitorios de otras células con el fin de eliminar su funcionamiento erróneo. En células cancerígenas estas señales inhibitorias se interrumpen capacitando a la célula a ignorar las campañas de señales fuertemente inhibitorias sobre su superficie. Componentes importantes de estas campañas inhibitorias, especificadas por genes supresores de tumores, están ausentes o inactivos en muchos tipos de cáncer. El factor de crecimiento transformante beta (TGFb) puede detener el crecimiento de células normales. Algunas células de cáncer de colon se vuelven sordas al TGFb inactivando el gen que codifica para el receptor de superficie de esta sustancia al igual que el gen DPC4 el cual regula negativamente al receptor de este factor de crecimiento.

Los supresores tumorales también pueden actuar bloqueando el flujo de señales estimuladoras del crecimiento. Un ejemplo es el producto del gen NF1 el cual atrapa a la proteína ras antes de que pueda emitir sus señales de crecimiento. Existen estudios en los que se demuestra que al introducir genes de supresores tumorales las células cancerosas pueden recuperarse del daño y regresar a la normalidad.

CICLO CELULAR

Los efectos inhibitorios y estimulatorios de la célula convergen en un aparato molecular en el núcleo de la célula llamado reloj del ciclo celular. Este reloj parece correr de forma apresurada aparentemente en todos los tipos de cáncer.

El ciclo celular se compone de cuatro etapas:

- Fase G1 (Intervalo 1): En esta etapa la célula aumenta de tamaño y se prepara para replicar su DNA.
- Fase S (Síntesis): En esta fase la célula sintetiza nuevo DNA y duplica precisamente a sus cromosomas.
- Fase G2 (Intervalo 2): En este intervalo la célula se prepara para la mitosis, que es cuando la célula finalmente se divide en dos. La nueva hija entra inmediatamente en fase G1 comenzando el ciclo celular.
- Fase G0 : Esta fase es cuando la célula descansa, es decir es el lapso de tiempo entre la fase G1 y la fase de síntesis.

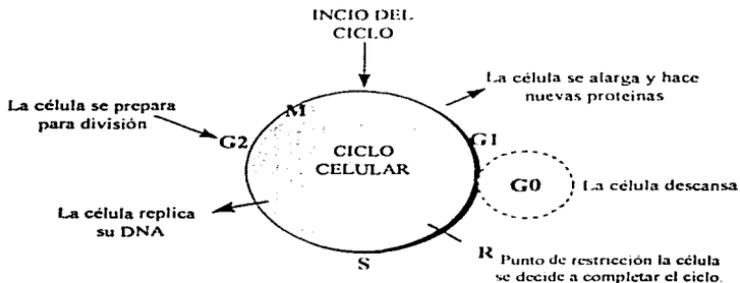


Fig. 1. Weinberg A. Robert 1996

El control del reloj del ciclo celular se lleva a cabo mediante dos componentes esenciales, las ciclinas (de las que hay cuatro grupos, las D, E, A y B) y las cinasas dependientes de ciclinas (CDK's). La asociación de unas con otras da lugar al inicio del ciclo celular, en G1 por ejemplo las ciclinas tipo D se unen a CDK 4 o 6, el complejo actúa sobre una poderosa proteína inhibitoria del desarrollo, llamada pRB entonces se rompe el efecto de pRB y la célula progresa a fase G1 y de ahí a fase S. Existen varias proteínas que pueden inhibir la continuidad del ciclo celular como son p16 y p15 las cuales actúan bloqueando la actividad del complemento de las CDK's de las ciclinas D evitando que la célula avance de G1 a S. Otro inhibidor de las CDK's es p21 (WAF1), el cual bajo el control de p53 monitorea la salud de la célula y la integridad del DNA cromosomal así como el cierre exitoso de cada una de las etapas del ciclo.

CICLO CELULAR Y CANCER

En las células cancerosas se presenta un crecimiento inadecuado no solo porque las señales celulares están alteradas, sino también porque el reloj del ciclo celular se desajusta. Este reloj generalmente integra mensajes de las rutas inhibitorias y estimuladoras, y si los mensajes estimuladores están en exceso entonces la célula avanza hacia su ciclo de crecimiento y división.

Una etapa crucial es pasar el punto R y entrar en S, un "switch" molecular debe ser conectado para dar este paso, este "switch" funciona de la siguiente manera: conforme aumentan los niveles de ciclinas D y E estas proteínas se combinan con las cinasas dependientes de ciclinas las cuales enganchan grupos fosfato a partir de ATP y los transfieren a la proteína pRB, proteína característica inhibitoria de control del ciclo celular. Cuando pRB no está fosforilada bloquea el ciclo secuestrando a factores de transcripción, pero cuando las ciclinas cinasas han añadido suficientes grupos fosfato a pRB impidiendo su funcionalidad, entonces los factores de transcripción son liberados y pueden actuar en los genes que se encargan de la proliferación celular.

Se ha encontrado que las ciclinas D, E y CDK4 presentan hiperactividad en ciertos cánceres humanos, también se ha encontrado la inhibición de ciertas proteínas que regulan negativamente el ciclo celular.

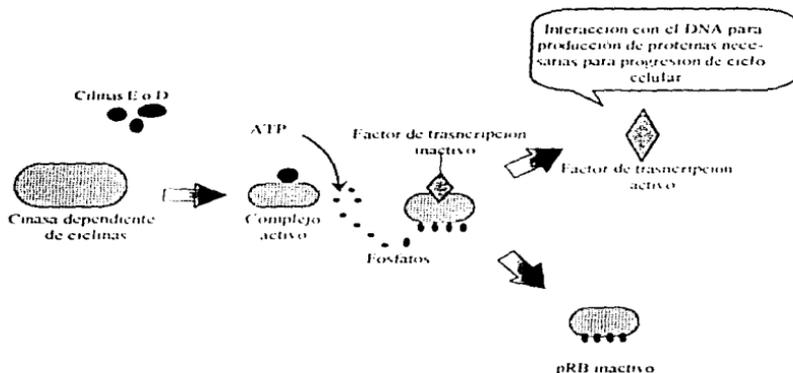


Fig 2 Weinberg A Robert 1996

ALGUNOS GENES INVOLUCRADOS EN CANCER (Weinberg Robert A 1996).

ONCOGENES

Genes que codifican para segundos mensajeros citoplasmáticos

Ki - ras	Implicado en cáncer de pulmón, ovario, colon y páncreas
N- ras	Implicado en leucemias

Genes que codifican para factores de transcripción que activan genes que promueven el crecimiento

c-myc	Implicado en leucemias, y cáncer de mama, pulmón y estómago.
N-myc	Involucrado en neuroblastoma y glioblastoma
L-mys	Codifica para un antagonista de p53

Genes que codifican para otras moléculas

Bcl-2	Codifica para una proteína que impide apoptosis
Bcl-1 o PRAD1	Codifica para la ciclina D1, estimulante del ciclo celular
MDM-2	Codifica para un antagonista de p53

Genes que codifican para factores de crecimiento o sus receptores

PDGF	Codifica para el factor de crecimiento derivado de plaquetas. Implicado en glioma
erb-B	Codifica para el receptor de crecimiento epidermal. Implicado en glioblastoma
erb-B2 o HER-2 o neu	Codifica para un factor de crecimiento. Implicado en cáncer de mama y ovario
RET	Codifica para un receptor de un factor de crecimiento. Implicado en cáncer de tiroides

SUPRESORES TUMORALES

Genes que codifican para proteínas citoplasmáticas

APC	Implicado en cáncer de colon y estómago
DPC-4	Codifica para una molécula que participa en la cascada de señalización e inhibe división celular
NF-1	Codifica para una proteína que inhibe a Ras(estimuladora) implicado en cáncer de sistema nervioso periférico leucemia mielóide.
NF-2	Involucrado en meningioma.

Genes que codifican para proteínas nucleares.

MTS1	Codifica para la proteína p16 que es un componente del control del ciclo celular.
RB	Codifica para la proteína pRB crucial en el control negativo de ciclo celular. Implicada en retinoblastoma, y cáncer de vejiga, hueso, pulmón mama.
P53	Codifica para la proteína p53 que puede impedir división celular e inducir a apoptosis. Implicada en múltiples cánceres.
WT1	Involucrado en el tumor de Wilms de riñón.

Genes que codifican para proteínas cuya localización celular no esta clara

BRCA 1	Implicado en cáncer de mama y ovario
BRCA 2	Involucrado en cáncer de mama
VHL	Relacionado con cáncer renal celular

Los tejidos suprimen la proliferación celular para evadir el cáncer, es decir, previenen una excesiva multiplicación privando a la célula de factores estimulantes del crecimiento, rodeándolas de factores antiproliferativos. Sin embargo las células en su camino hacia el cáncer sobrepasan estos controles: se estimulan a si mismas y no responden al control exterior y las mutaciones subsecuentes impiden a la célula responder a los sistemas de control. Los tumores que surgen en los diferentes tejidos emergen de alguna célula dañada genéticamente y que de alguna forma logra evadir el programa apoptótico. Respecto a este punto, las terapias intentan devolverle a la célula su capacidad para conducir a apoptosis y así combatir la malignidad mejorando la efectividad de las estrategias de radio y quimioterapia.

Una opción diferente a la de apoptosis para evitar que las células continúen una proliferación descontrolada es a través de un mecanismo que cuenta y limita el número total de veces que la célula se reproduce. El encargado de este mecanismo es un elemento llamado telómero el cual lleva la cuenta del número de replications por las

que pasa una población celular, los tiempos apropiados, el inicio de la senectud y la crisis de crecimiento celular.

El telómero se acorta un poco cada vez que los cromosomas se duplican durante la fase S. Una vez que los telómeros han reducido tres veces su tamaño envía una señal que le indica a la célula que es hora de entrar a la senectud celular. Si la célula se desvía de este proceso entonces entra en crisis, el acortamiento extremo de los telómeros provoca que los cromosomas se unan unos con otros o que se rompan creando un caos genético, fatal para la célula (Weinberg Robert A 1996).

Este mecanismo de defensa celular es violado durante el desarrollo de la mayoría de los cánceres, debido a la activación de un gen que codifica para la enzima telomerasa. Esta enzima está virtualmente ausente en células sanas, pero la encontramos en células cancerígenas. La telomerasa regenera sistemáticamente segmentos del telómero manteniendo su integridad y por lo tanto, capacitando a la célula a dividirse indefinidamente. También permite que la célula crezca, al mismo tiempo que acumula mutaciones que aumentan su habilidad de replicación, invasividad y metástasis (Webster K. Cavenee 1995).

Es por esta razón que muchas compañías farmacéuticas intentan desarrollar fármacos capaces de inhibir a la telomerasa.

CANCER CERVICO-UTERINO

El cáncer es la segunda causa de morbilidad y mortalidad en nuestro país, sólo después de las enfermedades del corazón. (Instituto Nacional de Cancerología INCan, Biomédicas, Noticiero Biomédicas Mayo 1997)

El cáncer cervico uterino es la primera causa de mortalidad por cáncer en mujeres de edad reproductiva en nuestro país. Destaca la importancia del estudio de este tipo de cáncer, por su alta incidencia en México, ya que de 1990 a 1993, 630 instituciones públicas y privadas de toda la república notificaron más de 180 mil nuevos casos de este padecimiento. En 1994 se registraron 63 mil nuevos casos y 46 mil fallecimientos por esta causa. En total, la enfermedad provocó de 1985 a 1992 una pérdida de más de 50 mil años de vida productiva.

En el INCan las neoplasias genitales ocupan el primer lugar en incidencia, de éstas la más importante es el cáncer cervico uterino, seguido del de mama, con un pico importante a la edad de 50 años (Biomédicas, Noticiero Biomédicas 1997). Del total de pacientes atendidos, 45% son del D.F. y área conurbada, mientras que el resto es del interior de la República.

Al parecer el cáncer cervico uterino es producido por uno o más tipos de Virus de Papiloma Humano (VPH) y con mayor frecuencia por los tipos 16 y 18. Actualmente se han identificado cerca de 90 tipos de VPH. Investigaciones en México revelan que la mayoría de los tumores de cérvix, carecen de un gen del VPH, el gen E2, el cual es el elemento más importante para el control de la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7, los cuales se producen de manera continua y permanente en las células de los tumores, por lo que estas células se immortalizan y los tumores crecen (Beth C. Etscheid, 1994).

PATOLOGIA

Más del 90% de los tumores de cérvix son del tipo de células escamosas, el 5% son adenocarcinomas y el resto son de tipo mesonéfrico o de células claras.

Se puede dividir a los carcinomas escamosos en tres subtipos histológicos: queratinizados, no queratinizados y de pequeñas células. Histológicamente el carcinoma escamoso está compuesto de núcleos y nidos de células epiteliales arregladas en una disposición al azar. Las células queratinizadas muestran lugares con cúmulos de queratina. Los tumores de células pequeñas tienen un huso o una apariencia pequeña y redonda, y el tumor está poco definido.

Es difícil diferenciar un adenocarcinoma del endocérvix, de un adenocarcinoma de endometrio, pues ambos forman glándulas mucosas. El carcinoma escamoso celular tiene su origen en la unión entre el canal endocervical y la porción del exocérvix, la lesión está frecuentemente asociada a antecedentes crónicos de cervicitis, displasia grave y carcinoma in situ. La progresión desde cervicitis crónica hasta carcinoma in situ o carcinoma invasivo, puede tomar de 10 a 20 años. El carcinoma cervical invasivo se define como la ruptura de la membrana del epitelio y la invasión al estroma.

CLASIFICACION del Cáncer Cérvico uterino: FIGO
(Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia)

ESTADIO	CARACTERISTICAS
0	Carcinoma in situ. Carcinoma Epitelial
I	El carcinoma esta confinado estrictamente al cérvix
IA Carcinoma microinvasivo	La profundidad de la invasión es menor a 3mm (Probabilidad de metástasis 1%)
IB Ocullo	La invasión del tumor es menor a 3mm, aún no es apreciable. Detectado por Papanicolaou (Pap) o colposcopia.
IB	La lesión es visible y puede presentar ulceración e infiltración excesiva al endocérvix.
IIA	Diseminación del tumor hacia lugares vaginales
IIB	Diseminación del tumor hacia tejidos paracervicales
III	El tumor de ha extendido hacia la pared pélvica o a la ultima parte de la unión vaginal al útero.
IV	El carcinoma se ha extendido más allá de la pelvis. El tumor invade directamente a la vagina o al recto. El riesgo de implicar a la aorta y causar metástasis es alto.
IVA	Diseminación de tumores a órganos adyacentes
IVB	Diseminación a órganos como: hígado, nódulos linfáticos, huesos y pulmones.

DIAGNOSTICO

El carcinoma invasivo de cérvix, puede ser detectado en un paciente asintomático mediante las pruebas periódicas del Papanicolau, puede estar presente flujo amarillento de olor pútrido, asociado con sangrado irregular. El dolor es un síntoma tardío e incluye a la región intrapantoneal. Los síntomas urinarios y rectales aparecen ya cuando la enfermedad local ha invadido. Los resultados del estudio del Papanicolau pueden clasificarse en I Normal, II Atípico, III Displasia, IV Carcinoma in situ y V Carcinoma invasivo.

En países industrializados (EUA) se realizan 50 millones de pruebas de Papanicolau cada año. Se detectan anomalías en 5-10% de las muestras. La mayoría de las anomalías son leves y consisten en células escamosas atípicas de significación indeterminada (ASCUS) o lesiones intraepiteliales escamosas de bajo grado (LSIL). El manejo de estas anomalías es problemático. La mayoría de las mujeres tiene lesiones que sanarán espontáneamente, pero una pequeña proporción tiene el riesgo de desarrollar lesiones de alto grado. Es necesario el desarrollo de un manejo óptimo de las anomalías de las pruebas del Pap.

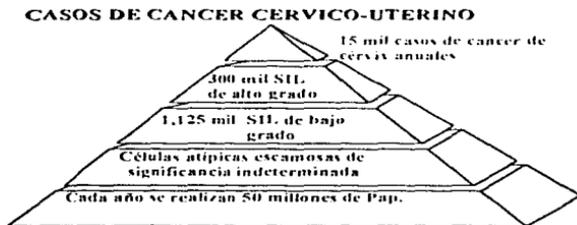


Fig. 3 Tomado de Diane Solomon, M.D. Pap Test Anomalities by Diagnosis JNCI 89, 7, 1997.

ETIOLOGÍA:

El cáncer de cérvix es una enfermedad multifactorial y multietapas como el resto de los casos de cáncer. Entre las causas que conducen al desarrollo de esta enfermedad, se encuentran: infección con Virus de Papiloma Humano pero la progresión de la enfermedad puede deberse a:

- Virus de Papiloma (VPH) de alto riesgo oncogénico, por ejemplo VPH 16, 18, 33 y 45.
- Uso prolongado de anticonceptivos
- Múltiples parejas sexuales.
- Hábitos de higiene inadecuados
- Existe cierta correlación entre hombres que no tienen la circuncisión y mujeres con cáncer de cérvix.
- No existe relación con la raza. Aunque las mujeres asiáticas presentan poca incidencia. Está asociado a niveles socioeconómicos bajos.

TRATAMIENTO DEL CANCER DE CERVIX

El objetivo de la quimioterapia es atacar selectivamente al proceso metabólico implicado en la condición patológica. El tratamiento del cáncer de cérvix se realiza principalmente a través de radiación e histerectomía, y como complemento se utiliza quimioterapia.

TRATAMIENTO SEGÚN LA PROGRESIÓN DEL CARCINOMA

ESTADO DEL CARCINOMA	TRATAMIENTO
Estado 0: Carcinoma in situ	Histerectomía, Radiación
Estado IA: Carcinoma microinvasivo	Histerectomía, Radiación
Estado IB: Cáncer invasivo solo en cérvix	Histerectomía, Radiación
Estado IIA:	Histerectomía, Radiación acoplada a aplicación de estrógenos, para tratar esterilidad
Estado IIB, IIIA, IIIB	Radiación definitiva. A veces cirugía.

La combinación de radioterapia con quimioterapia, ofrece un mayor rendimiento de recuperación y respuesta, en ocasiones desde el 10 hasta el 93%, pero las respuestas al 100% son muy raras y generalmente tienen tiempos de vida cortos. Se han hecho estudios para evaluar la efectividad de la quimioterapia pre-operatoria sobretudo en pacientes con estadio III.

VIRUS DE PAPILOMA HUMANO (VPH)

GENERALIDADES

Los Virus de Papiloma Humano (VPH) pertenecen a la familia viral *Papoviridae* y al género *Papiloma*. Estos virus están ampliamente distribuidos e infectan tanto humanos como animales, y aunque entre ellos, comparten una organización genómica similar presentan un elevado grado de tropismo, es decir son muy específicos, en cuanto a la especie y tejido que infecta un determinado tipo de VPH.

Los Virus de Papiloma comenzaron a estudiarse en la década de 1930 por Rous quien quería establecer una relación entre infecciones por virus y el desarrollo de cáncer. Pero ya desde 1922 se había detectado que extractos de papilomas podían inducir verrucosis en humanos con cáncer de piel, después de la exposición a luz solar, a este síndrome se le llamó *Epidermoplastia verruciformis*. La primera vez que se visualizaron los Virus de Papiloma (VP) en verrugas humanas fue por microscopía electrónica en 1949. Hacia 1959 se reportó que ciertos papiloma virus bovinos, inducían cáncer de vejiga en el ganado bovino. El interés sobre los VP evolucionó hacia la segunda mitad de los 70's cuando se desarrolló la hipótesis de que los virus de papiloma tenían un papel importante en la etiología del cáncer de cérvix. La investigación estaba enfocada al descubrimiento de nuevos tipos de VP.

Hacia 1980 el aislamiento de los tipos VPH 6 y 11 de verrugas genitales y seguidos de los tipos 18 y 16 aislados de biopsias de cáncer de cérvix, provocaron una gran expansión del trabajo experimental en esta área. Se necesitó una década para que se aceptara el papel específico de los VPH en el cáncer de cérvix y lesiones asociadas.

Actualmente el interés, está enfocada en cómo los genes de estos virus afectan el crecimiento celular y cómo sus oncoproteínas interactúan con los componentes de la célula huésped. El estudio de los VP emerge como los virus más comunes en cáncer, y parecen jugar un papel "secreto" como principal patógeno del cáncer.

ESTRUCTURA

Los viriones de Virus de Papiloma Humano son de 55-60nm de diámetro, son virus no envueltos de forma icosaédrica, de 7500 a 8000 pb. de DNA de doble hélice circular unido covalentemente, empacado en un complejo de nucleohistona.

tiene una geometría icosaédrica y está compuesta por 72 capsómeros pentaméricos. A través de micrografías microelectrónicas, se sabe que existen capsómeros pentavalentes, y otros hexavalentes. Hasta ahora no se ha determinado su estructura cristalina, por cristalografía de rayos X.

Las dos proteínas que constituyen su cápside se denominan: L1 y L2, siendo la primera la principal, ya que ciertos experimentos indican que los elementos estructurales de la mayoría o si no es que todos los capsómeros, están constituidos por L1 (John T. Schiller et al 1995), la cual tiene un peso molecular de 55 000 g/mol al parecer L1 contiene epitopes reactivos para neutralización específica (Harald zur Hausen 1996). L2 es una proteína de 75 000 g/mol y esta menos conservada que L1 entre los diferentes tipos de VP. El capsómero es una estructura relativamente resistente al calor y a disolventes orgánicos.

Al parecer L2 es un elemento que aumenta la formación de los capsómeros, se expresa al mismo tiempo que L1 y se incorpora a la cápside por cada 30 unidades de L1. Solo una pequeña parte de la proteína L2 está expuesta en la superficie de los viriones, al parecer su extremo amino terminal se une no específicamente al DNA in vitro, sugiriendo que L2 puede estar implicado en la interacción con el genoma del virus.

Para que se lleve a cabo la infección, es necesaria la expresión tanto de L1 como de L2, ya que si la cápside esta compuesta solo por L1 el virión no contendrá DNA, indicando que L2 tiene una función específica en la formación del capsómero.

Generalmente solo una hebra de DNA es transcripcionalmente activa, por lo que la transcripción ocurre solamente en una dirección.

EVENTOS INICIALES DE LA INFECCION POR VPH

Al parecer la afinidad que tienen los VPHs por una determinada superficie celular no depende de la presencia de la proteína de cápside L2. Los VPHs se unen a una variedad de líneas celulares epiteliales, neuronales o mesenquimales sugiriendo que el

receptor de superficie de membrana para los VP está ampliamente distribuido entre las especies y se ha conservado evolutivamente.

El tropismo de estos virus está determinado por la especie o por la distribución de los receptores en los tejidos, esta gran especificidad parece estar determinada por algún evento posterior a la unión al receptor en el ciclo infeccioso.

Se ha estimado que existen aproximadamente 2.6×10^4 receptores de superficie para VPH 33 en la línea celular HeLa (John T. Schiller et al 1995). La unión de los VPH al receptor, se ve disminuida a elevadas concentraciones de sales y se elimina a pH 7.8. Los capsómeros disociados, no se unen a la superficie celular, ni compiten con los VPH por su unión, indicando que los contactos entre capsómeros, son necesarios para su interacción con el receptor, si la superficie celular se expone a tripsina, se inhibe la unión de los VPH a la superficie, esto sugiere que al menos parte del receptor es de naturaleza proteica y hasta ahora no hay evidencia de que existan carbohidratos implicados en la unión virión-receptor (John T. Schiller et al 1995).

CLASIFICACIÓN

Ya que las proteínas de cápside de estos virus son antigénicamente similares, los virus de papiloma no se clasifican como serotipos, sino como genotipos y subtipos basándose en la falta de correlación de la secuencia de DNA entre ellos. Inicialmente, se clasificaba a un VPH como un tipo diferente si su homología en secuencia de DNA era menor al 50% de la secuencia del DNA de VPHs ya conocidos, después se utilizaron comparaciones de los genes E6, E7 y L1 para designar nuevos virus, es decir si había diferencias de más del 10% en relación a los prototipos, se podía definir un nuevo tipo de virus. A partir de 1995 se estableció que bastaba una diferencia del 10% en la secuencia del gen L1 para que se clasificara como un nuevo virus. Actualmente se conocen más de 77 diferentes genotipos de VPH y aunque son similares estructuralmente, muestran gran especificidad respecto a la localización anatómica del epitelio al cual infectan además del tipo de lesión particular que producen en el sitio de infección. Se cree que el número total de genotipos del VPH excede a los 100.

Pocas veces ocurren cambios mutacionales, lo que indica que la diversificación en diferentes tipos, data desde tiempos prehistóricos.

Basándose en la composición de ácidos nucleicos se pueden definir subgrupos, por ejemplo el subgrupo más grande es el que infecta principalmente superficies de mucosas y más frecuentemente las del tracto anogenital, se han identificado más de 40 tipos de VPH que pertenecen a este grupo, el prototipo es el VPH 16. Otro subgrupo es el que se encuentra en lesiones de epidermoplastia verruciformis siendo el miembro más prominente el VPH 5. El tercer subgrupo contempla pocos virus encontrados en lesiones cutáneas, el prototipo de este subgrupo es el VPH 4. El cuarto subgrupo es heterogéneo lo componen algunos virus con poca relación como VPH 1, VPH 63, VPH 41.

Además se han identificado 8 tipos de virus de papiloma bovino, otros son caninos, de monos o de conejo. Es interesante hacer notar que los virus de papiloma de animales están más íntimamente relacionados con ciertos tipos de virus humanos que entre ellos mismos. Esto lleva a pensar que el desarrollo del grupo de los virus de papiloma se establece desde hace muchísimo tiempo.

Todos los VPHs conocidos son epiteliotrópicos ya que infectan sitios específicos del epitelio y provocan frecuentemente proliferaciones focales en éste. Los VPHs cutáneos, son los que causan las verrugas comunes y a estas se encuentra asociado alguno de los tipos de VPH como 1, 2, 4, 26, 27, 29, 41 ó 52.

Asociados a infecciones del tracto ano genital de hombres y mujeres se han caracterizado 23 tipos de VPHs entre los que se encuentran 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 39, 40, 42-45, 51-58 y 61 (Tjoun-Wang P. et al 1995) estos tipos se encuentran asociados desde *Condilomata acuminata* (pequeñas verrugas planas que se presentan en el tracto ano-genital) hasta carcinoma escamoso invasivo.

Los VPH se clasifican en tres diferentes categorías de riesgo oncogénico en función a su asociación con cáncer invasivo de vulva, vagina, cérvix.

Los tipos de VPH 6, 11, 16 y 53 son los tipos más comúnmente detectados en mujeres, que no presentan enfermedades cervicales o vulvares. Las verrugas presentes en el tracto genital masculino se asocian principalmente al VPH tipo 6, 16 y 42.

Los tipos de VPH 6 y 11 son los dos tipos que predominan en la infección del cérvix en mujeres con Lesiones Intraepiteliales de Bajo Grado (SIL) es decir Neoplasia Intraepitelial Cervical grado 1 (CIN 1) al menos hasta los 80's Sin embargo, en estudios más recientes los tipos 6 y 11 del VPH asociado a este tipo de neoplasia abarca solo el 20%, también se han encontrado los tipos 18 y 16 presentes en combinación, en un 20% en este tipo de lesiones. Actualmente la mayor parte de los VPHs asociados a este tipo de lesiones son nuevas o son tipos irreconocibles de estos virus.

También puede ser común la infección con dos tipos diferentes de VPH en mujeres con CIN 1 o SIL de bajo grado, incluso puede ocurrir la infección de dos tipos diferentes de VPH en una sola célula

Las Lesiones Intraepiteliales Escamosas (SIL) de alto grado y la (Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN 2 y 3) se encuentran frecuentemente asociadas con el tipo 16 del VPH. Este tipo de VPH se ha encontrado presente entre el 30 y 77% de las mujeres con SIL de alto grado (CIN 2 y 3) (Tiejung Wong P. et al 1995). Aproximadamente tres cuartas partes de estas lesiones están asociadas con el VPH 16 o bien con el VPH 18 o miembros del grupo de los tipos 30 (31, 33, 35 ó 39).

En el cáncer invasivo algunos de los tipos de VPH detectados se encuentran también en SIL de alto grado (CIN 2,3).

Los tipos de VPH 16, 18 y 31 son los que más se encuentran asociados al cáncer de cérvix invasivo en mujeres de todo el mundo. Otros tipos de VPHs incluyen: 45 y 56, varios del grupo de los 30s y los tipos 51, 52, y 58.

Estas asociaciones de VPH con determinadas lesiones en cáncer cérvico-uterino, llevan a la clasificación de los VPHs anogenitales en tres grupos diferentes de riesgo oncogénico:

- a) **Grupo de Alto Riesgo Oncogénico:** En esta clasificación predominan los tipos 16, 18 y 31 que se encuentran asociados regularmente en mujeres con SIL de alto grado (CIN), cáncer invasivo de cérvix, vulva, pene y ano. Frecuentemente también se encuentran en este grupo los tipos 46 y 56. Los tipos de VPH de este grupo, inmortalizan los queratinocitos humanos. Las oncoproteínas provenientes de estos

virus se unen a los supresores tumorales pRB y p53. Inducen a aberraciones cromosómicas interfiriendo con los mecanismos de control del ciclo celular. Además este grupo de virus pueden actuar como carcinógenos solitarios. Estos virus, portan elementos de respuesta a glucocorticoides lo que aumenta la inmortalización por el VPH 16. Se sabe que la transformación celular por VPH es dependiente de hormonas lo que sugiere alguna relación entre un mayor riesgo para desarrollar cáncer de cérvix y el uso prolongado de anticonceptivos orales.

- b) Grupo de Bajo Riesgo Oncogénico que incluye los tipos de VPH: 6, 11, 42, 43 y 44 así como nuevos tipos de VPH. Este grupo de virus se encuentra asociado con C. *Acuminata* y en ocasiones con SIL de bajo grado (CIN 1) pero muy raras veces asociado a cáncer invasivo. Los tipos de VPH de este grupo, son incapaces de inmortalizar queratinocitos humanos en cultivo, su unión con proteínas supresoras de tumores, no es eficiente. Su papel dentro de la carcinogénesis no está esclarecido del todo, se supone que actúan asociadas con otros carcinógenos físicos o químicos. Su fracaso aparente para codificar oncoproteínas parece ser la principal causa de que no puedan actuar como carcinógenos solitarios por lo que dependen de la interacción con otros factores mutagénicos (Harald zur Hausen 1996).
- c) Grupo de Riesgo Oncogénico Intermedio. Los VPHs que no se encuentran en los otros dos grupos se clasifican en este grupo ya que están asociados con lesiones intraepiteliales de alto grado (CIN 2,3), pero raras veces se encuentran en cáncer anogenital invasivo en este grupo se encuentran los tipos: 33, 35, 39, 51 y 52.

Los VPH 16 y 18 pertenecen al mismo grupo de alto riesgo oncogénico sin embargo estudios realizados (Berumen Jaime 1994) demuestran que la infección por estos virus no causa los mismos eventos moleculares.

Cáncer con VPH 18	Cáncer con VPH 16
Existe bajo número de copias del genoma del VPH por célula (\leq a 150).	Son dos veces más frecuentes que el VPH 18. Existe un elevado número de copias del genoma del VPH por célula (\geq a 200).
No se encuentran los genes o fragmentos de E1/E2.	El 67% de los casos presenta E1/E2. El 33% restante que no tienen E1/E2 suelen tener pocas copias del genoma. Semejante a una infección por VPH 18.
El genoma de estos virus siempre está integrado al genoma celular.	No siempre están integrados, a veces se mantienen como episomas.
No siempre se los encuentra en tejidos de células bien diferenciadas.	Siempre están en tejidos de células bien diferenciadas.

El número de copias de VPH/célula no tiene correlación significativa con el estado clínico del tumor, pero sí con el grado de diferenciación histológica. Aunque estas correlaciones son dependientes de la presencia o ausencia del gen E1/E2.

MECANISMOS MOLECULARES DE INDUCCIÓN DE CÁNCER POR VIRUS

El mantenimiento y desarrollo de un organismo vivo requiere controles sobre la proliferación celular y sobre la expresión de diferenciación celular. Estos dos eventos a veces mutuamente excluyentes, son resultado de la interacción de estímulos externos a la célula, y el mecanismo intracelular. Los estímulos pueden ser endocrinos, paracrinos o autócrinos y tienen efecto solo en las células que presentan receptores apropiados para la señal y la maquinaria adecuada para procesar la señal a segundos mensajeros, además de la capacidad suficiente para responder.

Alteraciones en estos controles pueden llevar a un aumento en masa de tejido local dado por un estímulo anormal sobre una célula normal, o bien puede ser que sea un estímulo normal y que la célula este alterada y su comportamiento esta fuera de control, convirtiéndose en una célula neoplásica.

Un mecanismo patogénico considera que las células tumorales o sus ancestros normales estaban infectados por virus, en estos casos todo o al menos parte del genoma viral persiste en la línea tumoral. La persistencia del genoma viral proporciona puntos clave como marcadores, ya que la porción del genoma viral está siempre presente insertada en una determinada región del DNA del huésped.

CRITERIOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DEL VPH
COMO AGENTE ETIOLOGICO DEL CANCER DE CERVIX

Desde hace algunas décadas se intentó definir al VPH como el agente infeccioso causal del Cáncer de Cérvix tomando en cuenta los postulados de Koch, sin embargo de esa forma no fue posible, ya que es muy difícil propagar in vitro a los virus o no son tumorigénicos para animales de laboratorio. Por esto se han establecido ciertos criterios en el establecimiento de la causalidad de este tipo de cáncer por VPH:

- a) Evidencia epidemiológica (determinación del riesgo, coincidencias en prevalencia geográfica y seroepidemiología)
- b) Presencia frecuente y persistencia de ácidos nucleicos del agente infeccioso en cuestión en tumores malignos específicos
- c) Estimulación de la proliferación después de transfecciones del genoma viral en células en estudio.
- d) Demostración de que la inducción de la proliferación y el fenotipo maligno de células tumorales específicas es debido a la presencia y persistencia del DNA del agente infeccioso.

El criterio más convincente proveniente de experimentos es que al eliminar el genoma viral en células de carcinoma de cervix, trae como consecuencia una disminución en la velocidad de proliferación. Estas evidencias se han comprobado.

La aplicación de estos criterios ha resultado útil, para sistemas virales que se sospecha tienen que ver en la carcinogénesis.

La presencia constante de un segmento del genoma viral, ya sea libre (extracromosomal o episoma) o integrada al azar en el genoma del huésped sugiere que la presencia del producto del oncogen viral contribuye al fenotipo neoplásico.

Ciertos oncogenes comprometen elementos importantes del ciclo celular del huésped.

MECANISMOS DE CARCINOGENESIS VIRAL

MECANISMO PATOGENICO	EJEMPLOS
Partes importantes del genoma viral, permanece en las células tumorales: 1. Los Virus portan uno o varios oncogenes cuyos productos inician o mantienen la neoplasia.	Tipos transformantes de ciertos retrovirus: papovavirus, adenovirus, Epstein Barr virus, virus de leucemia felina, virus de leucemia humana de linfocitos T
Integración del genoma en el cromosoma del huésped para facilitar carcinogénesis por inserción.	Tipos no transformantes de retrovirus, tal vez virus de la hepatitis B y algunos virus de papiloma
Posiblemente no sea necesario un gen viral específico o la presencia de su estructura. El DNA viral puede actuar transitoriamente, tal vez como mutágeno y puede que no permanezca	Algunos herpes virus y virus de papiloma bovinos

VIRUS DE PAPILOMA EN HUMANOS

Las infecciones más comunes son las verrugas causadas por los VPH tipos: 1,2,3 y 4, que aparecen en las manos y en los pies generalmente se presentan en la infancia y se transmiten mecánicamente a través del contacto.

Los tipos de VPH que infectan el tracto genito-urinario son transmitidos durante las relaciones sexuales y abarca los tipos: 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 54, 55, 56, 57, 58, y 59, probablemente se transmiten por medio de escamas infecciosas que se remueven de las lesiones durante la relación. La infección por VPH es la infección más común transmitida sexualmente y se presenta en individuos sexualmente activos con un pico de incidencia entre los 18 y 30 años. Los estudios revelan ya desde hace tiempo que las infecciones con VPH juegan un papel etiológico en el desarrollo del cáncer de cérvix. El VPH infecta varios lugares del conducto vaginal, y es posible que infecte al feto durante el parto a partir de las escamas provenientes de la madre infectada. En mujeres puede infectar la piel de la vulva (genitales externos), la piel alrededor del ano, la vagina y el cérvix. Los hombres pueden desarrollar verrugas en la entrada de la uretra, sobre y bajo el prepucio, alrededor del

ano y a lo largo del pene. Sin embargo, no siempre que exista la infección con VPH se desarrollarán verrugas.

Una vez que una persona presenta verrugas visibles probablemente portará el virus el resto de su vida, una persona que no tiene verrugas pero tiene una historia clínica que revela la presencia de verrugas aún puede transmitir el virus a otras personas. Desgraciadamente, no existe una forma efectiva de que los individuos sexualmente activos (especialmente los que tienen varias parejas) se prevengan ante el VPH.

Se espera que en un futuro se desarrolle una vacuna o una cura contra el VPH, mientras tanto es necesario recordar:

- Hacer la prueba del Papanicolaou con regularidad
- Se recomienda el uso de condones y espermaticidas durante relaciones sexuales.
- El cuerpo desarrolla cierta inmunidad por lo que las verrugas pueden desaparecer sin tratamiento.
- El VPH no interfiere con la habilidad en la mujer, para tener hijos y llevar una vida normal (<http://Papilloma-virus.ahc.org> 1997)

VIRUS DE PAPILOMA HUMANO Y ENFERMEDADES RELACIONADAS

CIN: Ectoplasia Intraepitelial Cervical, EV: epidermodisplasia verruciformis, presenta inmunidad disminuida, PIN: Ectoplasia Intraepitelial penil, VIH: Ectoplasia Intraepitelial Vulvar HIV: Virus de InmunoDeficiencia Humana, Tepley and Wilson (1994)

TIPO DE VPH	LESIONES ASOCIADAS	TIPO DE VPH	LESIONES ASOCIADAS
1	Verrugas en manos y pies	39	Papulosis, CIN, Carcinoma cervical
2	Verrugas comunes en manos	40	CIN I, PIN
3	Verrugas juveniles planas	41	Carcinoma celular escamoso
4	Manchas y lesiones en pacientes EV	42	CIN, VIH
5	Verrugas en manos y pies	43 y 44	CIN
6	Condilomata acuminata CIN I, Verrugas laringeas	45	CIN I, Carcinoma cervical
7	Verrugas del carnicero	46	Manchas en pacientes con la Enfermedad de Hodgkin
8 y 9	Manchas y lesiones en pacientes EV	47	Verrugas en pacientes con EV

10	Verrugas planas	48	Carcinoma escamoso
11	Condilomata acuminata CII. Verrugas laringeas	49	Verrugas en pacientes con transplantes
12	Manchas y lesiones en pacientes EV	50	Verrugas en pacientes con EV
13	Lesiones hiperplásicas en la cavidad oral	51	CII Carcinoma de cérvix
14 y 15	Manchas y lesiones en pacientes EV	52	CII Carcinoma de cérvix
16	CII, VII, PII, carcinomas genitales	53	Tejido genital normal
17	Manchas y lesiones en pacientes EV	54	Condilomata acuminata
18	CII, carcinomas genitales	55	Papulosis
26	Verrugas cutáneas en pacientes inmunosuprimidos	56	CII Carcinoma de cérvix
27	Verrugas planas	57	Lesiones orales, CII
30	Carcinoma laringeo	58	CII
31	CII Carcinoma cervical	59	VII
32	Lesiones hiperplásicas de la cavidad oral	60	Quistes epidermoides
33	CII Carcinoma cervical	61 y 62	Neoplasia intraepitelial anogenital
34	Papulosis, CII	63	verruca mirmecia
20 - 25	Manchas y lesiones en pacientes EV	64	Neoplasia intraepitelial anogenital
26	Verrugas cutáneas en pacientes inmunosuprimidos	65	Verruga pigmentada
28 y 29	Verrugas cutáneas	66	carcinoma cervical
30	Carcinoma laringeo	67 y 68	Neoplasia intraepitelial anogenital
31	CII Carcinoma cervical	69	Neoplasia intraepitelial anogenital y cánceres
32	Lesiones hiperplásicas de la cavidad oral	70	Papiloma vulvar
33	CII Carcinoma cervical	71	Neoplasia intraepitelial anogenital
34	Papulosis, CII	72 y 73	Papiloma oral (paciente con HIV)
35	CII Carcinoma de cérvix	74	Neoplasia intraepitelial anogenital
36	Queratosis actínica en pacientes EV	38	Melanoma maligno
37	Queratocantoma	75 a 77	Verrugas comunes

ORGANIZACIÓN GENOMICA DEL VPH

El genoma del virus está organizado en tres regiones principales: dos regiones que codifican para proteínas, la región de expresión temprana (E) que codifica para proteínas con funciones regulatorias encargadas de la persistencia del genoma, la replicación del DNA y la activación del ciclo lítico. La región de expresión tardía (L) que codifica para proteínas estructurales y la región reguladora LCR (long control region) o URR (upstream regulatory region) que abarca aproximadamente el 10% del genoma. Fig. 1 (Tjoun-Wong P. et al 1995)

La regulación de expresión de genes virales es compleja, y está regulada por factores de transcripción virales y celulares.

El genoma del Virus de Papiloma Humano se divide en tres regiones principales:

1. **Región de Regulación LCR o URR.** Esta región de regulación consta aproximadamente de 400 pares de bases y se encuentra adyacente al origen de la replicación viral. Esta región no codifica para proteínas, pero por otro lado contiene un complejo conjunto de sitios de unión para muchos activadores de la transcripción, incluyendo los factores de transcripción virales codificados por la región temprana. Esta región regula la transcripción de las regiones temprana y tardía y controla la producción viral de proteínas y partículas infecciosas. Juega un papel crucial en la determinación de la distribución en el huésped, de diferentes tipos de VPHs. La región LCR varía considerablemente en su composición de nucleótidos entre los diferentes tipos de VPH. Para el VPH tipo 18 se han identificado múltiples factores de unión entre los que se encuentran KRF, AP1 y el receptor de glucocorticoides, la disfunción de algunos de estos tiene que ver con la carcinogénesis asociada con el VPH. La mayoría de estos factores se unen a la región central del LCR que es la región "aumentadora". Regulan la transcripción del promotor de los genes E6/E7 localizado en el extremo 3' terminal de esta región. La LCR del VPH 16 tiene cuatro sitios de unión para la proteína del gen E2, en la región central hay dos sitios para E2. El sitio de unión de E2 en la región 3' terminal se encarga de iniciar la

replicación, pero también modula la transcripción de E6/E7. Hay dos sitios de unión a E2 en la región cercana a los 90 pares de bases traslapándose con la caja TATA.

2. Región de Expresión Temprana: Se encuentra después de la Región Reguladora y consiste en seis marcos abiertos de lectura (ORF's) designados como E1, E2, E4, E5, E6 y E7. Los marcos abiertos de lectura son fragmentos de DNA, es decir unidades transcripcionales, capaces de codificar para una proteína. E6 y E7 codifican para oncoproteínas, las cuales son críticas, para la replicación viral y para la immortalización y transformación de la célula huésped. Los productos de los genes de E1 y E2 son también muy importantes, para la replicación viral. E1 codifica para dos proteínas individuales que son necesarias para la replicación extracromosomal del DNA y para completar el ciclo de vida del virus. Se sabe que la proteína E1 del VP bovino tiene actividad de ATPasa y helicasa, mientras que la proteína E1 del VPH tipo 11 solo tiene actividad de ATPasa. El gen E2 codifica para dos o probablemente tres proteínas individuales, que junto con E1 son necesarias para la replicación extracromosomal del DNA. Este ORF codifica para una proteína de 45-48 kDa la cual se ha visto que se une al DNA en forma de dímeros. Se ha establecido que la proteína tiene tres dominios funcionales. Tiene dos regiones las cuales son relativamente conservadas. Un dominio está hacia el lado amino terminal, el otro hacia el carboxilo terminal y están separadas por una región central que no es conservada y varía en longitud entre los diferentes virus. La proteína más grande del ORF E2 actúa como un activador transcripcional que se une a secuencias específicas de la Región Reguladora para aumentar la transcripción de la región temprana mientras que la proteína más pequeña del ORF E2 inhibe la transcripción de la región temprana. Los productos del gen E2 son proteínas que se unen a secuencias específicas que interactúan con la secuencia palindrómica ACCGNNNCGGT que se presenta varias veces en el DNA viral (Johnattan Ham. et al 1991).

Activación de la transcripción por E2: Para que E2 actúe como factor transcripcional necesita sitios de unión en el promotor en configuración cis, y para que la transactivación sea intensa (de 20 a 100 veces) se necesitan dos sitios de unión para

E2, se cree que es porque las dos proteínas actúan sinérgicamente (Johnattan Ham, et al 1991) y aunque el mecanismo no está claro se supone que: las proteínas cooperan entre sí para unirse al DNA o bien se necesitan dos dímeros de E2 para una transactivación eficiente.

Entre las propiedades de E2 están: el aumento considerable de la transcripción cuando está unida a cierta distancia del promotor, puede activar eficientemente promotores como los del Herpes Virus o el virus SV40 cuando sus genomas son adyacentes a los del promotor. Se cree que un dímero de la proteína E2 que se une cerca del promotor puede facilitar la activación de dímeros de E2 que se encuentran distantes, tal vez porque estabiliza las hélices. Aún no se sabe cual es el blanco de la activación de E2, pudiera ser que como estimula la transcripción fomentando uniones entre proteínas celulares, el blanco de acción sean los componentes de la maquinaria de la transcripción, como la RNA polimerasa II.

Represión de la transcripción por E2: E2, a través del dominio carboxilo terminal puede reprimir la transcripción por medio de tres diferentes mecanismos (Harald zur Hausen 1996): a)La parte amino terminal de las formas truncadas, de E2 pueden dimerizarse y unirse al DNA pero no se pueden transactivar a sí mismas por lo tanto interfieren con el efecto positivo de los transactivadores, E2 actúa sobre los promotores que tienen sitios de unión para E2 ya sea ocupando los sitios de E2 o formando heterodímeros inactivos. . b)La unión del transactivador E2 a la forma represora de E2 uniéndose al sitio operador (sitio para un elemento del promotor) y c)Si la proteína completa E2 se une a sus sitios de unión en el URR que está cerca de la caja TATA impide que se acomode al complejo inicial de la transcripción que dirige la caja TATA.

Papel de E2 en la replicación: E2 se establece en sus sitios de unión cerca del origen de replicación causando cambios en la estructura de la cromatina o en la conformación del DNA (se sabe que E2 dobla al DNA), lo cual es importante para que comience la replicación. Tal vez el papel de E2 es más directo; puede interactuar con proteínas necesarias para la replicación viral (un ejemplo es el caso del Virus de Papiloma Bovino BPV) y facilita la formación del complejo inicial de replicación.

Existe otra hipótesis (Johnnatan Ham, et al 1991) E2 puede interactuar con E1 directamente en el origen de replicación, al menos en BPV. Las formas poco fosforiladas, o no fosforiladas de E2 son las que se unen preferencialmente a E1, lo que indica que la fosforilación puede regular el inicio de la replicación en tumores de cáncer de cérvix infectados con VPH cuando su genoma se encuentra integrado, al ocurrir este proceso se interrumpen las funciones de E2, lo que indica que E2 modula las funciones transformantes del virus por lo que es un factor crucial para conducir un proceso benigno en maligno, en células infectadas.

A la proteína E4 se le asigna incorrectamente como producto de expresión temprana. Se origina del RNA transcrito y formado por un solo splicing. Este RNAm es el principal transcrito presente en lesiones inducidas por VPH codifica para una proteína que tiene un motivo de dedo de zinc y las consecuencias de esta funcionalidad se desconocen.

El papel de esta proteína en el ciclo viral aún no se conoce, no es necesaria para la transformación o persistencia episomal del DNA. Se localiza exclusivamente en la capa diferenciada del epitelio infectado. Se ha especulado que esta proteína tiene un papel en la infección, tal vez interfiriendo con la diferenciación normal, estableciendo las condiciones óptimas para la maduración viral. Al parecer la proteína E4 es importante para la maduración y replicación del virus y al igual que las proteínas L1 y L2 de la cápside, se expresan en los estados tardíos de infección cuando se conforman los viriones completos.

Parece que E4 codifica para un grupo amino terminal para la proteína E1 que proviene de un RNAm que sufrió un "splicing" esta proteína tiene propiedades para colapsar la red de queratina del citoplasma lo que causa el característico aclaramiento nuclear o halos (koilocitosis) que se observa histológica y citológicamente en células infectadas por VPH, E5 es la principal proteína transformante de los virus de papiloma bovinos en contraste con los VPH E5 que tiene débil acción transformante, puede causar transformación tumorigénica en queratinocitos de ratón y estimula el crecimiento de células epiteliales de riñón de rata. Este gen se encuentra frecuentemente deletado en cáncer de cérvix.

Sin embargo las neoplasias anogenitales contienen grandes cantidades de RNA m de este gen, esto puede sugerir que E5 juega un papel en los primeros pasos en la infección por VPH, pero es obvio que es indispensable para el mantenimiento de la transformación maligna. E5 es una proteína hidrofoba localizada principalmente en el Aparato de Golgi y también en membranas plasmáticas.

En estudios recientes (Harald zur Hausen 1996) se ha observado que E5 del HPV 16 forma complejos con el receptor del factor de crecimiento epidérmico y con el receptor beta del factor de crecimiento derivado de plaquetas, también se asocia con la ATPasa de membrana. Poco se sabe acerca del papel funcional de E5, en el ciclo viral. Esta proteína interactúa con los receptores de membrana de la célula lo que puede estimular la proliferación celular.

3. *Región de Expresión Tardía:* Esta región contiene dos marcos abiertos de lectura (ORF's) llamados L1 y L2 los cuales codifican para las proteínas de la cápside viral. El ORF L1 codifica para la principal proteína de cápside la cual está altamente conservada, entre las diferentes especies de papilomas. Los anticuerpos anti L1 pueden neutralizar a los VPH de una forma específica. Se han realizado investigaciones para producir esta proteína L1 y formar viriones vacíos para poder utilizarlos como vacunas es decir como fuente de antígenos o como marcadores clínicos (John T. Schiller 1995).

L2 codifica para la proteína más pequeña de la cápside y es la que mayor variación presenta entre los diferentes tipos de VPHs, a diferencia de L1, esta proteína se ha utilizado para crear antígenos específicos o anticuerpos HPV. La transcripción de las regiones L1 y L2 ocurre solo cuando se están ensamblando los viriones completos. Al parecer esta transcripción está regulada por factores celulares reguladores de la transcripción producidos solo en células epiteliales bien diferenciadas, es decir en las capas más externas del epitelio infectado. La localización de estos factores de transcripción en las células escamosas más diferenciadas, explica porque la producción de los viriones y los efectos citopatológicos del VPH son más pronunciados en lesiones de bajo grado. Estas

lesiones mantienen relativamente buena diferenciación de las células escamosas epiteliales.

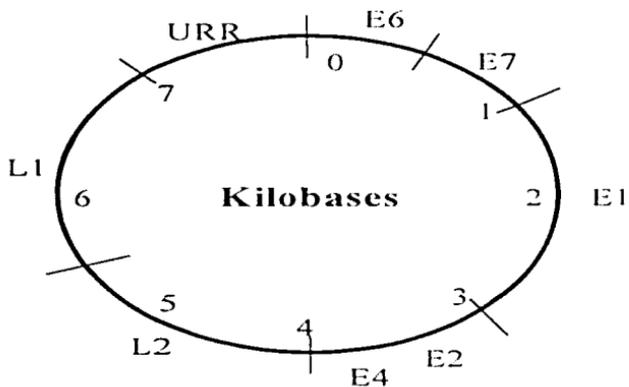


Fig4: Organización genómica de los Virus de Papiloma Humano (Tjoun-Wong P. et al 1995).

VIRUS DE PAPILOMA Y CANCER CERVICO-UTERINO

Aproximadamente el 90% de los 440 000 casos anuales de cáncer cervico uterino que aparecen mundialmente son atribuibles a la infección con Virus de Papiloma Humano (Mark H. Schiffman et al 1995). La epidemiología del cáncer invasivo de cérvix implica varios grados de lesiones precursoras, comenzando con la infección

por VPH. Aunque la infección es necesaria no es suficiente para la inducción de cáncer. La infección con VPH contribuye directamente a la carcinogénesis, mientras el DNA viral esté presente y activo en las células malignas.

DIFERENCIA ENTRE INFECCION Y LESION POR VPH

INFECCION: las infecciones anogenitales por VPH no son ubicuas pero si muy frecuentes y pueden no ser detectadas visiblemente, incluso el 35 % son portadores sanos pues solo se les ha detectado la infección mediante técnicas de amplificación (PCR). No hay tratamiento alguno para erradicar a los portadores sanos. Un portador sano tiene once veces más probabilidades de desarrollar en diez años Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN) de alto grado. Sin embargo sería prematuro iniciar algún tratamiento, antes de que se presente alguna lesión.

LESION: Existen dos grandes categorías de lesiones asociadas a los VPH. Las asociadas a los VPH 6 y 11, representadas esencialmente por condilomas (verrugas planas) y un conjunto de lesiones definidas como de bajo grado (condilomas planos y displasias ligeras). Lesiones asociadas a los VPH 16 y 18 que se conocen como lesiones de alto grado (displasias medias a severas). Además encontramos lesiones que parecen de alto grado pero no siempre evolucionan hasta lesiones cancerosas, este tipo de lesiones están asociadas a los VPH 31, 33, 35 entre otras (J. Mansonegro 1997).

FUNCIONES TRANSFORMANTES DE LOS VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

Las células derivadas de tumores malignos, muestran dos características de crecimiento in vitro: 1.inmortalización la cual implica que inducen el crecimiento continuo in vitro sin tumorigenicidad detectable. La habilidad de crecimiento de estas células, en ausencia de un sustrato fijo es característica de las células totalmente transformadas y es un evento separado a la inmortalización. 2. transformación lo que se define como crecimiento continuo de las células con formación y crecimiento de tumores invasivos. Las células inmortalizadas en cultivos parecen histológicamente a lesiones Intraepiteliales de bajo grado. Los primeros intentos de inmortalizar células con VPH fueron en 1984 y 1986. La primera inmortalización celular con VPH 16 fue en 1987 y

con VPH 18 en 1988 (Harald zur Hausen 1996). En realidad sólo se necesitan fragmentos de DNA viral que contenga los genes E6/E7 necesarios para la inmortalización.

Los genes encargados de prevenir la inmortalización inducida por virus no se han identificado, aún se cree que estos genes codifican para el inhibidor de la cinasas dependientes de ciclinas, p16^{INK4}. Esta proteína está regulada positivamente en condiciones de inactivación de pRB. Mientras la interacción pE7:pRB provoca la inactivación de pRB, la regulación positiva de p16^{INK4} puede contribuir a limitar el crecimiento de células primarias infectadas con VPH 16 provocando que las células se vuelvan viejas después de cierto tiempo. Esto puede explicar el deterioro funcional de la expresión de las oncoproteínas del VPH.

La introducción de VPH 16 o 18 en líneas celulares de roedores que ya están inmortalizadas provoca que las células desarrollen la capacidad de anclaje o adherencia al recipiente donde se cultivan, independientemente de su capacidad para desarrollar tumores en organismos vivos. Sin embargo cuando se inyecta VPH 16 o 18 a células no inmortalizadas, éstas no se transforman y no pueden formar tumores al inyectarlas en organismos vivos, pero desarrollan la capacidad de volverse inmortales.

Las líneas celulares tumorales con VPH, contienen transcritos de RNA mensajero (RNAm) de E6 y E7 lo cual sugiere que estos genes del virus, son necesarios para el mantenimiento del fenotipo transformado. E7 puede, por sí mismo inmortalizar células, como queratinocitos humanos, este efecto se ve aumentado cuando se introducen E7 y E6 juntas, mientras que E6 no puede inmortalizar queratinocitos humanos por sí mismo, pero puede transformar en cultivo células epiteliales mamarias humanas.

Estudios epidemiológicos, indican que existe un largo período de latencia, entre la infección inicial con VPH y la progresión a lesiones de mayor grado, además de que solo parte de ellos desarrollan lesiones de alto grado.

GÉNES E6 Y E7

Ambas proteínas causan inmortalización de queratinocitos humanos y en muchas otras células, se encuentran frecuentemente en tumores malignos infectados por VPH de

alto riesgo. Las proteínas de estos genes estimulan el crecimiento celular y son relevantes para la progresión a crecimiento maligno

ONCOPROTEINA E6

E6 codifica para una proteína unida a zinc de aproximadamente 150 aminoácidos, tiene cuatro motivos de Cys-X-X-Cys que ayudan a la unión del zinc. Está estructuralmente relacionada con la proteína del adenovirus E1B y al antígeno T del virus SV 40. Al parecer la proteína E6 altera el crecimiento a través de sus efectos sobre p53 (supresor tumoral endógeno). p53 es una proteína nuclear que regula negativamente el crecimiento y la división celular.

La unión de la proteína E6 de VPH 16 o 18 a p53 da como resultado la pérdida de la actividad del supresor tumoral pues facilita la degradación de p53 por la ruta proteolítica de la ubiquitina (Anders Isaksson, 1996). Por lo tanto los niveles de p53 en células que presentan E6 de VPH 16 o 18 son bajos. La degradación proteolítica de p53 por la vía de la ubiquitina está mediada por una proteína celular llamada "proteína asociada a E6" (E6-AP). En comparación con la proteína E6 de VPH de bajo riesgo oncogénico, la proteína E6 proveniente de VPH de alto riesgo oncogénico (16 o 18) parece tener una mayor afinidad por p53, o parece acelerar su degradación. Las células que carecen de p53 no son capaces de detener el ciclo celular en G1 para reparar daños en el DNA por lo que se provoca inestabilidad genómica. Se ha visto que E6 proveniente de VPH de alto riesgo coopera con el oncogen ras para immortalizar células de roedores y transactiva al promotor del adenovirus E2 (Harold zur Hausen 1996).

E6 Y CICLO CELULAR

Se sabe que los niveles de la proteína p53 normal aumentan en respuesta al daño del DNA y su acumulación induce detención de ciclo celular al final de la fase G1 para que la célula pueda reparar el daño genético y se mantenga la integridad del genoma antes de que continúe a fase S. Por el contrario células que presentan formas mutadas de p53 no pueden detener ciclo celular después del daño al DNA.

P53 estimula la transcripción de genes que inhiben el crecimiento ya sea directamente, o a través de interacciones, con otros factores de regulación del

crecimiento. Uno de estos factores de crecimiento es WAF1/Cip1 que es un inhibidor de las ciclinas dependiente de cinasas (Bruce E. Clurman et al. 1995). Fig. 2 (Tjong- Won Park 1995).

Durante el control del ciclo celular, altos niveles de p53 normal inducen a WAF1 éste a su vez inhibe a las cinasas dependientes de ciclinas las cuales son esenciales para la progresión del ciclo celular, por lo tanto si los niveles de p53 están disminuidos en células infectadas con VPHs de alto riesgo oncogénico se provoca una *desregulación* en la progresión del ciclo celular permitiendo la acumulación de mutaciones genéticas. Independientemente de la degradación proteolítica de p53, la proteína E6 puede además disgregar los complejos formados entre p53 y el DNA y de esta forma disminuir la activación transcripcional de p53. Incluso se ha visto que E6 inhibe la formación de los complejos de alta afinidad entre p53 y el DNA también de forma independiente a la degradación proteolítica. La interacción de E6 con p53 es la principal causa de inestabilidad cromosómica lo cual puede ser el principal factor de riesgo en la progresión de las lesiones pre-malignas E2 (Harald zur Hausen 1996).

El acortamiento del telómero es un evento que se presenta de forma consistente con la senectud celular, mientras que la activación de la telomerasa y la recuperación del tamaño del telómero así como su estabilización ocurre en células inmortalizadas.

Un estudio reciente demostró que la telomerasa se activa en presencia del producto del gen E6 del VPH 16 (Harald zur Hausen 1996) incluso en queratinocitos que no pudieron inmortalizarse por transfección con E6, lo que indica que la activación de la telomerasa es insuficiente para la inmortalización.

ONCOPROTEÍNA E7

El gen E7 codifica para una pequeña fosfoproteína nuclear unida a zinc de aproximadamente 98 aminoácidos, tiene dos dominios Cys-XX-Cys (Harald zur Hausen 1996) lo que la hace similar a E6. La región amino terminal contiene dos dominios los cuales están estructuralmente relacionados con la proteína transformante E1A del adenovirus y con el antígeno T del virus SV40 los cuales conservan algunas secuencias de aminoácidos semejantes con las que se unen al producto del gen del retinoblastoma

pRB (supresor tumoral) y sus proteínas relacionadas p107 y p130 y forman complejos con E2F junto con factores de transcripción.

En condiciones normales la proteína pRB, p107 y p130 forman complejos con el gen E2F y sus factores de transcripción (E2F promueve la transcripción de genes para la síntesis de DNA) regulando así negativamente el ciclo celular inhibiendo la transcripción de genes que codifican para proteínas necesarias para la síntesis de DNA como la timidina cinasa, dihidrofolato reductasa y la DNA polimerasa alfa, así como, los proto-oncogenes N-myc y c-myc. La proteína E7 altera la regulación del ciclo celular ya que al unirse a pRB y a sus proteínas relacionadas y disociar los complejos E2F-Rb causa la liberación de E2F, al estar E2F libre estimula la transcripción de los genes necesarios para la síntesis de DNA Fig. 3 (Jyoung-Won Park 1995)

En pocas palabras la unión E7/pRB libera al factor de transcripción E2F del complejo formado con pRB activando la transcripción de genes que promueven la proliferación celular.

La proteína E7 proveniente de VPHs de bajo riesgo oncogénico como VPH6 tienen baja afinidad de unión a pRB comparado con E7 proveniente de VPH 16 o 18 que tienen una afinidad 10 veces mayor, la baja unión de E7 del VPH 6 se debe a la sustitución de un solo aminoácido en la posición 21 lo cual también afecta la habilidad de E7 para cooperar con el oncogen ras. Cuando la proteína E7 del VPH 6 se encuentra mutada de tal forma que el aminoácido es reemplazado por el aminoácido típico de las proteínas E7 pertenecientes a VPHs de alto riesgo oncogénico la afinidad de unión a pRB aumenta dramáticamente, también aumenta su capacidad transformante in vitro.

Estudios recientes (Harald zur Hausen 1996) demuestran que la expresión de E7 en células NIH3T3 resulta en una expresión constitutiva de las ciclinas E y A en ausencia de factores externos de crecimiento lo que conduce a proliferación. E7 forma complejos con factores de transcripción de AP1 como: c-jun, jun-B, jun-D y c-fos.

VIRUS DE PAPILOMA Y EL SUPRESOR TUMORAL p53

p53 es una proteína de 393 aminoácidos, en estados no patológicos se encuentra en el núcleo. Esta proteína tiene una vida media corta de 30 minutos. Inhibe el crecimiento de células tumorales en cultivo e inhibe la transformación de fibroblastos

por oncogenes. Presenta actividad de unión al DNA, actividad requerida para su función de activador de la transcripción (Karin Butz 1994).

Existen varios mecanismos por los cuales la funcionalidad de p53 puede inactivarse, uno de ellos es a través de la formación de complejos con productos de oncogenes virales, en este caso los oncogenes E6 y E7. La inactivación de p53 por E6 es el evento responsable de que la célula no pueda detenerse en la fase G1 del ciclo celular después del daño al DNA. El resultado es la acumulación de mutaciones en las subsecuentes divisiones celulares, lo que puede ser la pre-condición más importante para la selección clonal de células con mutaciones acumuladas para el control de la inmortalización. De esta forma la función inactiva de p53 parece representar el factor de progresión más importante.

No nada más la oncoproteína E6 del VPH es responsable de la degradación de p53. Varios virus han desarrollado proteínas especializadas que pueden inhibir las interacciones proteína proteína de p53 y además de otros supresores tumorales. La proteína E6-AP necesaria para procesos de degradación proteolítica por la vía de la ubiquitina, se une a E6 siempre y cuando esta proteína provenga de un virus de alto riesgo oncogénico. Esta unión promueve la multiubiquitinación de p53 y su subsecuente degradación (Anders Issaksons, 1996).

EFEECTO DE LAS ONCOPROTEÍNA E6 DEL VPH Y EL SUPRESOR TUMORAL p53

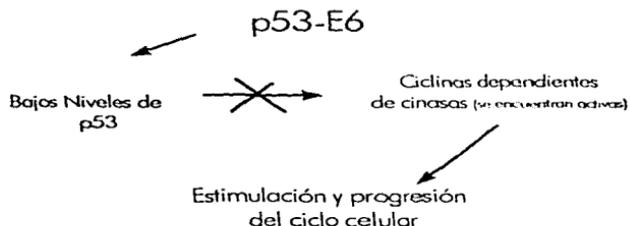


Fig. 5. Efecto de las oncoproteínas E6 del VPH de alto riesgo y p53. (Tjong- Won Park 1995).

DEGRADACION DE p53 DEBIDO A LA PRESENCIA DE E6

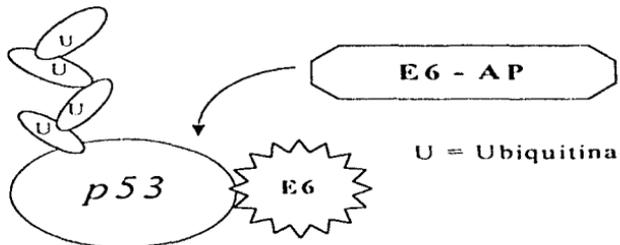


Fig. 6 Interacción de E6 con p53.

EFFECTO DE LAS ONCOPROTEINA E DEL VPH DE ALTO RIESGO Y EL SUPRESOR TUMORAL pRb

a) En condiciones fisiológicas.

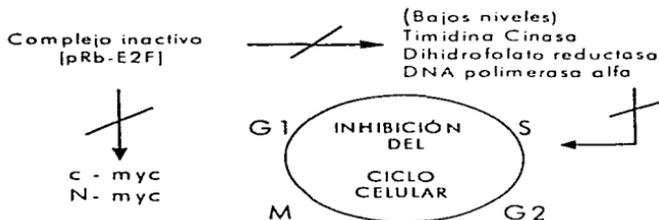


Fig. 7 Función normal de pRb. (Joung-Won Park 1995)

b) Durante la infección con VPH de alto riesgo.

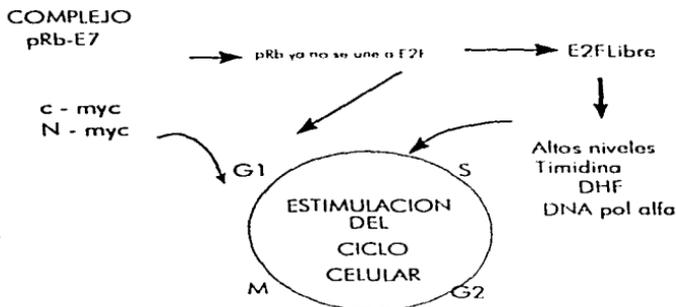


Fig 8. Relación entre la proteína E7 de VPH de alto riesgo y pRb.

MODIFICACION GENÉTICA	EFFECTO CLÍNICO
Inducción de inestabilidad cromosómica	No hay modificaciones visibles
Interrupción de cascadas metabólicas celulares (CIF I). Interferencia con las funciones de oncogenes	Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN) de bajo grado
Integración del DNA viral y desregulación parcial de la expresión de E6/E7.	CIN de alto grado
Interrupción de cascadas metabólicas celulares bajo control parácrino CIF II suprimiendo la transcripción de los oncogenes virales.	Carcinoma in situ
Fallas inmunológicas en el control de las células modificadas por VPH.	Carcinoma invasivo

ESTADO FÍSICO DE LOS VIRUS DE PAPILOMA EN CÁNCER DE CÉRVIX Y LESIONES PRECURSORAS:

En lesiones benignas de cáncer de cérvix el DNA viral se mantiene libre, de forma circular extracromosomal llamado "episoma". Sin embargo en muchos cánceres de

cérvix así como en líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix el DNA de los VPHs está integrado al genoma del huésped. En ciertos estudios se ha demostrado que el DNA de los VPH 18 siempre se encuentran integrados al genoma celular del huésped, mientras que el DNA del VPH 16 no siempre está integrado y se encuentra como episomas (Jaime Berumen et. al 1994). El VPH se encuentra integrado en el 72% de los casos infectados con VPH 16 y 100% en casos con VPH 18 (Park et al 1995) en algunos casos se puede detectar en la misma muestra de tejido el genoma del virus ya sea integrado, o en forma de episoma.

También el número de copias de DNA viral por célula tiene correlación con el grado de diferenciación histológica, pero no así con el estado clínico del tumor.

Se piensa que la integración del DNA viral al genoma celular tiene efectos importantes en la expresión de los genes virales y en el comportamiento biológico de las células infectadas por VPH. El acto físico de integración rompe el genoma del VPH en la región E1E2 mientras que se mantiene la integridad de los genes E6 y E7. Debido a que los genes E1 y E2 codifican para proteínas que actúan como represores transcripcionales, al integrarse el genoma se interrumpe esta represión y entonces hay un aumento en la expresión de los genes E6 y E7. En un estudio realizado con muestras de pacientes mexicanos se encontró que la región E1/E2 nunca estaba presente en tumores infectados con VPH 18 (este VPH siempre está integrado) mientras que en tumores infectados con VPH 16 la región E1/E2 se encuentra presente en un 67% (este VPH a veces se encuentra como episoma) Cabe mencionar que en este mismo estudio se detectó que en tumores con VPH 18 el número de copias del genoma viral por célula es bajo, en comparación con el número de copias de DNA de VPH 16 por célula. (Jaime Berumen et. al 1994).

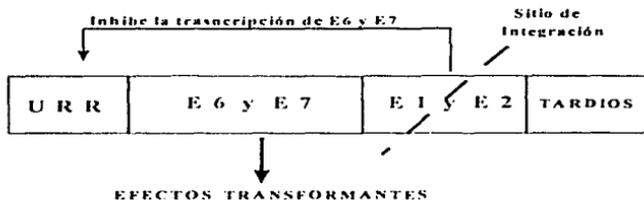


Fig. 9. Consecuencias de la integración del genoma viral al genoma del huésped. (T'jong-Won Park 1995) La integración física generalmente separa el genoma viral en las regiones E1 y E2.

El sitio en el que el VPH se integra dentro del DNA cromosomal humano es variable, y no se ha identificado un lugar preferencialmente específico de inserción. En líneas celulares o en queratinocitos humanos inmortalizados e infectados con VPH se ha rastreado y mapeado el DNA viral en o entre regiones frágiles las cuales son regiones cromosomales que son particularmente susceptibles a la integración de DNA extraño o de otros mutágenos. También se les ha detectado cerca de oncogenes como c-myc y N-myc, la interrupción y rearrreglos en estas regiones, puede conducir a inestabilidad genómica y a la activación de oncogenes celulares y por consiguiente puede promover la progresión tumoral.

A pesar que la integración del genoma viral parezca un punto clave en el desarrollo de muchos cánceres de cérvix está claro que no es necesario para la carcinogénesis cervical, pues muchos tumores sólo contienen DNA viral episomal. Además el modelo de la ruptura física de los genes E1/E2 promoviendo la sobreexpresión de los genes E6 y E7 que conllevan a la transformación es probable que aún se esté considerando muy simple ya que muchos cánceres contienen ambas formas de DNA del VPH: episomal e integrado.

El largo periodo de latencia entre la infección con VPH y el desarrollo del cáncer cervical indica que la infección con el VPH no es suficiente para la carcinogénesis. Además la carcinogénesis asociada al VPH, es un proceso ineficiente pues solo un pequeño porcentaje de mujeres infectadas con VPHs de alto riesgo oncogénico,

desarrollarán cáncer cervical invasivo. Esto sugiere que deben existir otros factores y eventos celulares como alteraciones cromosomales que tal vez sean necesarias para el desarrollo de la carcinogénesis.

a) Virus Herpes Simple (HSV 2):

El (HSV 2) es un cofactor potencial en la carcinogénesis cervical pues en varios estudios epidemiológicos y biológicos, se le ha encontrado asociado al cáncer de cérvix. Se ha encontrado que en mujeres con cáncer de cérvix invasivo y no invasivo tienen altos niveles de anticuerpos anti-HSV 2 comparado con mujeres normales. En un estudio en Latinoamérica se encontró que existía un riesgo 1.6 veces mayor de desarrollar cáncer de cérvix en mujeres que presentan anticuerpos anti-HSV2. Mujeres que son HSV 2 seropositivas y tienen VPH 16 o 18 tienen dos veces mayor probabilidad de presentar la enfermedad comparadas con mujeres que sólo presentan VPH 16 o 18, sugiriendo que puede existir un mecanismo sinérgico entre VPH y HSV 2. Se ha encontrado que el HSV-2 es capaz de transformar las células in vitro y muestran rearrreglos en su DNA semejantes a los presentados por las secuencias de DNA de VPH 18 se cree que su actividad sinérgica puede ser como iniciador o promotor de la carcinogénesis.

b) Alteraciones Cromosómicas:

En estudios citogenéticos de cáncer cervical invasivo se han detectado diferentes alteraciones numéricas y estructurales en varios cromosomas. Estos patrones de alteración cromosómica son muy complejos y no presentan anormalidades específicas en el cariotipo ni rearrreglos específicos.

Se ha encontrado que el cromosoma 1 es el que más frecuentemente está alterado, aunque también los cromosomas 4, 5, 6, 11, 13, 17, 18, y 21 están a veces involucrados.

En un estudio de 148 tumores, el 95% presentaron alteraciones cromosómicas. Como alteraciones numéricas, predominantemente pérdida del cromosoma 1 (54% de los casos), deleciones, isocromosomas, y traslocaciones generalmente en las regiones: 1p11-p13 y 1q21-q32. Las traslocaciones más frecuentes fueron entre el cromosoma 1 y el 3.

c) Pérdida de la Heterocigocidad

Al parecer solo se necesita una copia del supresor tumoral para mantener la función normal celular. En la mayoría de los tumores que pierden la funcionalidad de algún supresor tumoral como pRB o APC por mutación en uno de los alelos del gen supresor, este acontecimiento se ve acompañado por la pérdida (delección) del alelo no mutado a lo que procede la pérdida de largas secuencias de DNA. La combinación de la mutación de un alelo con la delección del otro no mutado resulta en la pérdida de la homociguidad del alelo recesivo mutado.

La identificación de segmentos cromosomales específicos que se pierden durante la carcinogénesis puede ser utilizada, para detectar potenciales supresores tumorales. Las pérdidas alélicas del brazo corto del cromosoma 3 se han detectado con frecuencia en otros carcinomas epiteliales como en cáncer renal, de mama, cuello y adenocarcinoma de pulmón.

Se ha detectado la pérdida alélica en el brazo corto del cromosoma 5(5p) en 56% de los cánceres invasivos, y en 21% de lesiones precancerosas lo cual puede sugerir la presencia de un posible supresor tumoral presente en el cromosoma 5 (Park et. al 1995).

Existe gran controversia para determinar si el cáncer cervical invasivo muestra pérdida de la heterociguidad en el cromosoma 17 que porta el gen para el supresor tumoral p53. Este es un sitio común de la pérdida de la heterociguidad en cáncer de mama, ovario, pulmón y tracto gastrointestinal. Sin embargo el carcinoma cervical presenta baja incidencia de la pérdida de heterociguidad del cromosoma 17p. Esto es porque la proteína E6 proveniente de VPH de alto riesgo oncogénico como VPH 16 o 18 al unirse a la proteína p53 estimula su pronta degradación proteolítica por lo que se ha sugerido que mutaciones en p53 o pérdida de heterociguidad en el cromosoma 17p13.3 no será encontrado en cáncer de cérvix infectado con VPH de alto riesgo oncogénico.

En líneas celulares de cáncer de cérvix que no presentan VPH tienen mutaciones en p53, mientras que líneas celulares con carcinoma de cérvix que contienen DNA de VPH tienen p53 normal al respecto existe cierta controversia pues en algunos estudios (Scheffner Martin 1991) han encontrado mutaciones en el gen de p53 aún cuando las

líneas celulares presentan VPH. Y otros confirman que la presencia de mutaciones en p53 en biopsias de tumores uterinos son raras aún cuando el tejido no esté infectado por VPH (Masami Fujita 1992).

En un estudio relativamente reciente (Mitra A.B. 1994) sobre análisis alelotípico de cáncer de cérvix se encontraron los siguientes datos respecto a pérdida de la heterocigocidad:

En más del 25% de los casos estudiados se perdió la heterocigocidad (LOH) en 10 brazos autosómicos y en el brazo largo del cromosoma X. Las regiones con pérdida alélica incluye los cromosomas: 1q, 3p, 4q, 5p, 5q, 6p, 10q, 11p, 18p y Xq. De los cuales el 1q,3p, 4q, 5q, 6p, 10q, 11p ya se habían identificado como posibles supresores tumorales. Mientras que las regiones 5p y Xq no se habían definido nunca antes como candidatos de supresores tumorales los cuales representan nuevos sitios de estudio para supresores tumorales. Sin embargo no se ha encontrado correlación entre la presencia o ausencia de infección por VPH y deleciones alélicas (Mitra A.B. 1994).

d) Alteraciones de Oncogenes:

Se ha reportado que son comunes los rearrreglos, amplificaciones, y sobreexpresión del proto-oncogen c-myc en carcinomas de cérvix. La amplificación de este proto-oncogen se ha visto asociada con el tamaño del tumor (Kumiko Jiko 1994). Otros estudios han detectado mutaciones y deleciones en el locus de c-Ha-ras en 24% de los casos en el codón 12 (Park et. al 1995).

RESPUESTA INMUNE ANTE LOS VPHs

Debido a que no se ha podido cultivar a los VPHs in vitro los estudios para determinar la respuesta inmune se han hecho a través de partículas semejantes a los virus (VPLs, de: virus like particles) a partir del descubrimiento de que las proteínas que constituyen la cápside de estos virus se ensamblan formando partículas semejantes a los virus. La mayoría de los anticuerpos para neutralizar a los VPHs son generados contra epitopes de la proteína L1, lo que indica que L1 es el inmunógeno más sencillo y efectivo.

En estudios realizados con pacientes que presentan verrugas cutáneas, el 40% presentan anticuerpos contra el VPH, tanto IgM como IgG.

En algunos estudios con mujeres que padecen de cáncer de cérvix, infectadas con VPH 16 (detectado por PCR) demostraron una respuesta serológica ante partículas semejantes al VPH 16. Utilizando las proteínas E6 y E7 que contienen epítopes conformacionalmente sensibles se encontró una correlación entre serorreactividad y cáncer de cérvix (Joel M. Palefsky 1995). Pero en realidad la determinación de anticuerpos anti-VPH no resulta un marcador sensible pues de 42 casos infectados con VPH detectados por la prueba de Papanicolaou solo el 67% correlacionó con el título de anticuerpos, y solo el 59% de los detectados por PCR. Utilizando péptidos lineales de la proteína E2 se obtuvo una respuesta del 89% de las mujeres que estaban infectadas con VPH. La ventaja es que se puede determinar infecciones pasadas por VPH en mujeres que ya no tienen DNA de VPH detectable proporcionando un punto de vista sobre el posible riesgo de una infección persistente y el desarrollo de cáncer de cérvix.

Las pruebas serológicas no pueden reemplazar a las citológicas como marcadores de determinación del riesgo de desarrollo de cáncer invasivo ya que la presencia de anticuerpos implica que la infección ya es sistémica, y muchas lesiones previas solo son locales, pero puede utilizarse como complemento en determinaciones clínicas.

RESPUESTA INMUNE CONTRA EL VPH EN CÁNCER DE CÉRVIX

El estudio de las respuestas inmunológicas contra el VPH se ha desarrollado porque se ha encontrado correlación de respuesta inmune y cáncer de cérvix o Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN).

Se han llevado a cabo ensayos serológicos con múltiples epítopes (por ejemplo extractos de verrugas o virus cultivados), útiles para determinar si el individuo es seropositivo o seronegativo, es decir si ha estado o no expuesto al virus. Sin embargo si se estudian las respuestas contra antígenos individuales, es posible distinguir entre individuos sanos, individuos que previamente han sido expuestos al virus, o aquellos que tienen infección latente o de pacientes que pueden desarrollar enfermedad por infección.

La velocidad de inducción de anticuerpos durante el desarrollo de enfermedades producidas por el VPH puede ser diferente debida a diferentes epitopes, algunas respuestas se originan rápidamente después de la infección pero otras se presentan en etapas tardías de la infección, hasta que los tumores con VPH aparecen. La memoria inmunológica de los diferentes epitopes también es variable algunos anticuerpos pueden permanecer incluso cuando la enfermedad ha desaparecido.

El uso clínico de antígenos compuestos, es decir aquellos de extractos solo ofrecen resultados informativos si el conjunto de antígenos solo tienen algunos epitopes dominantes específicos para una enfermedad.

La respuesta contra E7 esta determinada por el epitope en el amino terminal de la proteína E7. Tanto E6 como E7 contienen epitopes diferentes para los cuales se ha reportado una asociación entre la respuesta inmune y la presencia de cáncer cervical.

Un epitope altamente reactivo pero moderadamente asociado a la enfermedad de E6 es E6: 4. El epitope E6: 10 es altamente reactivo y asociado la enfermedad.

Para E7 del VPH 16, el antígeno E701 (Mueller) (Harald zur Hausen 1996) esta asociado con cáncer de cérvix pero no con Neoplasia Intraepitelial Cervical (CIN). Otros epitopes son E7/2 Vonka y E7: 2 Dillner.

En medio de la proteína E1 del VPH 16 hay dos epitopes que se traslapan el cual es altamente específico para cáncer de cérvix.

La proteína E2 del VPH 16 tiene varios epitopes el péptido 245 y el E2:9. La respuesta contra el E: 245 es elevada en pacientes con CIN y cáncer de cervix, el título de anticuerpos decrece después del tratamiento del CIN.

También existe una asociación entre los anticuerpos anti proteínas del VPH 18 y el cáncer de cérvix. Esta asociación es más elevada en pacientes con adenocarcinoma de cérvix. La respuesta a E2:9 es la única que es elevada tanto en cáncer de cérvix como en cáncer anal (Harald zur Hausen 1996).

Para E4 hay cuatro epitopes principales: E4:4 (Dillner) que se traslapa por 16 aminoácidos con E4/6(Vonka, Harald zur Hausen 1996). Estos tienen una asociación moderada a la enfermedad.

En el péptido L2 el epitope L2:49 es el más reactivo y esta asociado principalmente a condilomas benignos y no a cáncer de cérvix. En la región carboxi terminal de L2 existe un epitope que genera una respuesta IgA preferencial para CIN con VPH 16, la cual desaparece proporcionalmente con la regresión espontánea de la lesión cervical.

En la mitad de la región L1 se encuentra el epitope L1:13 cuya respuesta inmune es preferentemente en casos de cáncer de cérvix. Por otro lado en la región carboxiterminal de L1 existe un epitope altamente reactivo L1:31 pero no tienen asociación con la enfermedad.

DIAGNOSTICO

Cuando aparecen verrugas genitales, se sabe que son debidas al VPH y como se encuentran asociadas a cánceres genitales a veces es necesario identificarlos. Ya que los VPHs no pueden ser propagados en cultivos su identificación procede por alguno de los siguientes métodos:

- a) Inmunohistoquímica: En este caso muestras de las biopsias se utilizan para detectar proteínas de la cápside con anticuerpos comerciales. Sin embargo debido a que los virus no se encuentran distribuidos uniformemente en el tejido se detecta solamente del 30 al 50% de los antígenos virales presentes en el tejido. Además los anticuerpos tienen reacciones cruzadas entre los diferentes tipos de VPH por lo que no es posible determinar el tipo específico de VPH presente.
- b) Hibridación DNA-DNA: Este método es específico y sensible y consiste en extraer el DNA de la biopsia correrlo mediante electroforesis en gel de agarosa, traspararlo a una membrana de nitrocelulosa, y después con sondas específicas y radiactivas se detecta la presencia de un determinado tipo de VPH, pueden detectarse incluso pocas copias de DNA viral por célula pero tarda una semana en completarse. Una variante de este método es la hibridación in situ (directamente hibridar sobre la biopsia) pero se pierde sensibilidad y especificidad.
- c) PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa): Este es el método de elección, aunque presenta un costo elevado tiene una alta sensibilidad y especificidad. Consiste en extraer DNA de la muestra y después con oligonucleotidos específicos

amplificar una región particular para un determinado tipo de VPH, se analizan los productos de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa.

CONCEPTO DE CIF

La inmortalización requiere de la expresión de oncogenes, pero además necesita la falla funcional de los alelos que regulan la cascada de señalización, que interfiera con la actividad transcripcional de los oncogenes virales. Por esto se postula la existencia de el Factor Celular de Interferencia (CIF). Actualmente el enfoque de este CIF es hacia la cascada en cáncer ligado al VPH. Hay evidencia para creer que existe un control celular de la regulación de la transcripción de oncogenes virales en ciertas células. Tal es el caso de híbridos de células HeLa y fibroblastos que al ser tratados con azacitidina la transcripción de los oncogenes del VPH disminuye.

TRATAMIENTO DE LAS LESIONES CAUSADAS POR VPH

Las lesiones que merecen tratamiento son aquellas que son planas o papulares, en la vagina, vulva o región perianal.

Existen dos diferentes grupos de tratamiento los físicos y los químicos. Los tratamientos físicos son destructivos: Evaporación Laser-bioxido de carbono, electrocoagulación, nitrógeno líquido, electroditermia o cirugía; estos métodos se utilizan en lesiones cervicales y vulvares y algunos como el Láser o diatermia tienen éxito el 80-90% de los casos, los métodos físicos son los que se utilizan con mayor frecuencia por su precisión terapéutica, sobretodo en los casos donde se necesita un control histológico. Por otro lado los tratamientos destructivos incluyen a los tratamientos físicos y químicos, mientras que los tratamientos curativos, son los que tienen una acción antiviral y tienen su efecto en el punto mismo de la infección. Actualmente los tratamientos físicos no tienen una eficacia del 100% y un porcentaje de pacientes reincide en la enfermedad. Los tratamientos curativos tampoco son definitivos es decir; fuera de los interferones y las perspectivas de vacunación terapéutica, no hay un tratamiento verdaderamente eficaz contra la infección por VPH.

En el 40% de los casos las lesiones por VPH son plurifocales y/o multicéntricas, bajo estas circunstancias se evita un tratamiento químico pues existe el riesgo de que la terapia sea incompleta y fracase. Por esto es muy importante que antes de considerar un

determinado tratamiento se efectúe una colposcopia anogenital completa. La existencia de lesiones plurifocales de una condilomatosis anogenital no permite un tratamiento de monoterapia. De forma general, cuando las lesiones están localizadas en la región anogenital externa y si la superficie lesionada es menor a 3-4 cm² un tratamiento terapéutico es factible. Todas las lesiones tipo displasias necesitan un tratamiento físico.

MEDICAMENTOS UTILIZADOS

Los medicamentos utilizados para el tratamiento de las lesiones causadas por los VPH se basan en su capacidad para eliminar las capas de la epidermis que presentan la lesión. No son muchos los compuestos que existen para este tipo de lesiones, hay desde productos naturales como la podofilina hasta agentes químicos queratolíticos como el ácido tricloroacético.

- **Podofilina y derivados:** La podofilina es una resina de acción queratolítica y citotóxica. Se utiliza a concentraciones de casi 25% en etanol o propilenglicol. Se utilizan en el tratamiento de *Condylomata accuminata* de los genitales externos. La preparación se aplica en pequeñas cantidades directamente en la lesión, después de cuatro horas se lava la zona tratada. El tratamiento se aplica varias veces por semana por 4 semanas. El producto está contraindicado durante el embarazo, los efectos secundarios resultan de la aplicación en grandes cantidades o sobre extensas superficies mucosas. Se presentan náuseas, vómito y problemas neurológicos. Localmente los efectos están representados por reacciones cáusticas y sensación de quemadura. El porcentaje de recuperación varía considerablemente y está entre el 20 y 70% y los casos reincidentes pueden ser hasta el 50%.
La Podofilotoxina al 0.5% (*Condilina*) puede ser aplicada por el mismo paciente de dos a tres veces por día durante varios días. La eficacia y tolerancia es prácticamente la misma que la de la podofilina.
Estos dos medicamentos están indicados en *Condylomata accuminata* y las pápulas no pigmentadas de la vulva, perineo y pene.
Después de dos o tres reincidencias o la falta de eliminación de las lesiones durante un periodo de tres semanas de aplicación, se abandona el tratamiento.

- **Acido Tricloroacético:** Es un agente queratolítico que se utiliza diluido al 50 u 80% en el suero del paciente. Se aplica directamente sobre las lesiones anogenitales, una aplicación de varios segundos es suficiente entonces se observa una reacción blanca, la aplicación se repite dos a tres veces por semana durante tres semanas. Su efecto queratolítico, induce la destrucción del epitelio por la desnaturalización de proteínas celulares. El producto no se absorbe y la toxicidad es prácticamente nula, no es necesario enjuagar la zona tratada. El porcentaje de recuperación es idéntico a la de la podofilina. Este medicamento está indicado en *Condilomata accuminata*, pápulas no pigmentadas de la vulva, perineo y pene localizadas junto a la mucosa. También puede ser utilizado como tratamiento adyuvante en caso de reincidencia después del tratamiento con láser en la vulva, perineo, ano o canal anal.
- **5 Fluorouracilo:** Es un antimetabolito que se utiliza en pomada al 5% y se reserva para tratar lesiones vaginales y uretrales. El producto se introduce con una jeringa, la dosis para obtener un efecto clínico, es de casi 20-30g la cual se administra durante 5 días. Como efectos secundarios presenta irritación quemaduras y efectos cáusticos. El producto está contraindicado en mujeres embarazadas. El porcentaje de recuperación es de casi 60% en vagina, 50% en uretra y 60% si se utiliza después del tratamiento con láser para evitar reincidencias. Está indicado en condilomatosis vaginal y uretral.
- **Crioterapia:** Consiste en la utilización de nitrógeno líquido y dióxido de carbono en estado sólido (hielo seco). Se aplica directamente con presión hasta que aparezca un halo alrededor de la base del condiloma. Son suficientes tres aplicaciones por semana. No está contraindicado en mujeres embarazadas. El porcentaje de recuperación es del 75% en pacientes reincidentes con otras terapias. Está indicado en *Condilomata accuminata*, pápulas no pigmentadas de la vulva, perineo y pene cuando las lesiones no son muy numerosas, tejido dañado menor a 3 cm² y cuando la base del condiloma no es mayor a 5 mm.

- **Ratinoídes:** Son utilizados por su acción antiproliferativa, queratolítica, inmunomoduladora y rediferenciante. Se utiliza vía tópica en particular para displasias cervicales y prevención de la transformación celular en casos reincidentes, en este último caso los periodos de tratamiento son largos. Se ha reportado el efecto del ácido retinóico sobre la replicación del VPH. Los derivados del ácido retinóico tienen efectos secundarios como sequedad de las mucosas, caída del cabello, queratosis palmo-plantar, efectos metabólicos como hipertrigliceridemia o elevación de transaminasas. Estos productos están contraindicados durante el embarazo pues puede producir teratogenicidad inmediata o tardía. Se debe elegir la vía de administración oral para la prevención de reincidencia en caso de lesiones multicéntricas o de alto grado.
- **Interferón:** La mayoría de los casos de *Conditomata accuminata* y las displasias responden a los tratamientos físicos y medicinales. Sin embargo el 30% reincide. Al parecer la respuesta está influenciada por la inmunidad celular vía linfocitos T killer y linfocitos, estas células producen interleucina 2 e interferón gamma. El interferón se utiliza desde hace algunos años por su acción antiviral, inmunomoduladora y de diferenciación estos productos son administrados por vía parenteral o tópica. Se utiliza en el caso de *Conditomata accuminata* aunque se han obtenido resultados no consistentes. Por vía intramuscular la dosis es de 1 a 3 millones de unidades por día, por lo menos durante tres semanas, puede haber respuesta completa e inmediata en 43% de los casos aunque por vía intravenosa se obtienen mejores resultados así que la respuesta varíe del 45 al 60%. Entre los efectos secundarios encontramos dolor en la inyección, anestesia local previa y síndrome pseudogripal. Al parecer no hay ningún tratamiento farmacológico en casos de CIN, aunque por la eficiencia del interferón se evalúa actualmente su uso, pues generalmente está presente el interés de preservar la fecundidad y el futuro obstétrico del paciente muy joven.

CAUSAS DE LA FALTA DE EFICACIA DE LOS TRATAMIENTOS

Son distintas las causas del fracaso del tratamiento para los diferentes medicamentos, entre las principales explicaciones tenemos:

- a) Para la podofilina, la podofilotoxina, El nitrógeno líquido y el ácido tricloroacético el fracaso de su terapéutica tiene principalmente dos causas. La primera es la automedicación y el desconocimiento de las lesiones subclínicas. La segunda es el desconocimiento de las lesiones ocultas
- b) Para el 5 Fluorouracilo tópico la causa es la falta de utilización correcta además de los lavados sistemáticos después de su aplicación.
- c) El fracaso de los interferones puede estar ligado a una deficiencia inmunitaria o a la co-infección con HIV.

PERSPECTIVAS DE VACUNACION

Las perspectivas de vacunación están basadas en hechos reales. Se está esperando la puesta en marcha de un programa de vacunación, para tratar las lesiones de forma papilomatosas humanas de alto riesgo. Cabe resaltar la idea de la vacunación profiláctica, la cual puede ser considerada a través de proteínas estructurales de los virus, mientras que el desarrollo de la vacunación terapéutica se orienta hacia las proteínas no estructurales.

Otras ramas de investigación se orientan hacia las proteínas implicadas en la transformación (E6 y E7 provenientes de virus de alto riesgo) con la posibilidad de desarrollar una inmunidad contra esas proteínas.

Actualmente el tratamiento médico de primera intención hacia las lesiones anogenitales infectadas con VPH recurren a:

- Un examen colposcópico de la línea ano-genital. Son excluidas de un tratamiento médico las lesiones cervicales y las de canales internos (anales). En caso de lesiones multicéntricas o plurifocales o floridas es necesario emplear un tratamiento médico. El

éxito terapéutico depende de la respuesta al tratamiento destructivo o quirúrgico al mismo tiempo en todos los sitios.

- Un tratamiento local se lleva a cabo con eficacia si la superficie dañada es menor o igual a 3cm^2 y que el diámetro de la base de la lesión sea menor a 4mm.
- En caso de que la lesión sea en la vulva o región perianal un tratamiento médico es adecuado si no hay lesiones en canales internos de ano, vagina o cérvix.
- El tratamiento puede llevarse a cabo con varios medicamentos, en caso de persistencia o recidiva después de 3 o 4 semanas del tratamiento físico.

QUIMIOTERAPIA

Entre los objetivos de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer, se encuentran:

- **Cura:** eliminación de la enfermedad con una terapia agresiva por tiempo prolongado.
- **Paliativa:** los agentes antineoplásicos, pueden administrarse para controlar los síntomas o disminuir el tamaño del tumor, esa opción se elige cuando existe poca probabilidad de que el tumor se erradique totalmente.
- **Adyuvante:** Este tipo de quimioterapia se lleva a cabo para eliminar cualquier reminiscencia de la enfermedad y se administra con intención de cura total.
- **Quimioterapia Neoadyuvante:** Es una terapia más definitiva con el fin de eliminar la carga tumoral y eliminar la enfermedad a nivel microscópico.

El cáncer de cérvix se trata generalmente con radioterapia, o cirugía. Sin embargo la quimioterapia es útil para complementar los otros tratamientos (Charles E. Riggs 1993).

FARMACOS UTILIZADOS EN QUIMIOTERAPIA DEL CANCER DE CERVIX

AGENTE	TIPO DE COMPUESTO	% RESPUESTA
Ciclofosfamida (CTX)	Mostaza Nitrogenada	16
5-Fluorouracilo	Antimetabolito	20
Bleomicina (BLEO)	Antibiótico	10
Mitomicina C (MMC)	Antibiótico	22
Adriamicina (ADR)	Antibiótico	16
Metotrexato (MTX)	Antimetabolito	17-28
Cisplatino (DDP)	Citotóxico	23-50

COMBINACIONES

AGENTES	% RESPUESTA
CTX + ADR	10-30
ADR + MTX	12-66
BLEO + MMC	16-93
DDP + ADR	20-32
MTX + BLEO + DDP	89
DDP + MMC + BLEO + Vincristina	50-77

Actualmente, se sintetizan fármacos más eficientes y menos tóxicos esperando que puedan ser utilizados clínicamente con éxito.

La búsqueda de nuevos fármacos comienza con la síntesis de análogos a fármacos preexistentes con el fin de mejorar su efectividad y eliminar o disminuir reacciones secundarias. Las primeras pruebas a las que se somete un análogo para determinar su actividad es: a pruebas *in vitro* por ejemplo, probar su actividad en líneas celulares.

Otra manera de tratar el cáncer de cérvix, es atacando al principal factor etiológico: El Virus de Papiloma humano

Esta es una opción para el tratamiento preventivo del cáncer de cérvix. Es posible tratar las lesiones causadas por los VPHs cuando éstas son leves y no tienen más de 3-4 cm² ni son muy profundas. La terapia consiste en tratar físicamente a las lesiones con:

- Crioterapia (Nitrógeno líquido y CO₂)
- Podofilina
- Retinoides
- Ácido Tricloroacético
- 5 Fluorouracilo

Al parecer no hay muchos fármacos que estén dirigidos a atacar al Virus de Papiloma. Las moléculas que se proponen en este trabajo de tesis se diseñaron como moléculas con potencial actividad antiviral; contienen en su estructura un grupo funcional lactona, (grupo funcional asociado con propiedades antibióticas y antineoplásicas), como sucede con otros antibióticos como la camptotecina (Goodman y Gilman 1991).

CLASIFICACION DE AGENTES ANTINEOPLASICOS

- Agentes alquilantes: representados por mostazas nitrogenadas las cuales alquilan bases del DNA e impiden su correcta replicación, via despurinación o transiciones de bases. Ej. mecloretamina, ciclofosfamida.
- Antibióticos antitumorales: actúan por alquilación o intercalación entre las bases del DNA inhibiendo su síntesis. Ej. antraciclinas, mitomicina y bleomicina.
- Antimetabolitos Los antimetabolitos, son moléculas diseñadas como inhibidores competitivos de reacciones enzimáticas, en el metabolismo intermediario, o bien

actúan como análogos inactivos de sustratos de reacción de la síntesis de DNA y RNA. Entre los metabolitos encontramos a: 5 fluorouracilo, floxuridina, 6-tioguanina, 6-mercaptopurina, citarabina, metotrexato, azacitidina, y pentostatina.

- **Alcaloides derivados de plantas:** Los alcaloides de la vinca, detienen la mitosis celular durante la metafase, las podofilotoxinas, inhiben a la topoisomerasa II necesaria para la formación de DNA. Ej: vincristina, vinblastina, etoposidos y teniposido.
- **Agentes varios:** Se clasifican en este grupo a los agentes cuyo mecanismo de acción no se conoce o no se puede clasificar en alguna otra categoría. ejemplos:
 - a) **Hormonas:** Son compuestos que pueden tener varios efectos sobre las células. Entre ellos encontramos a los: corticoesteroides, estrógenos, progestinas, antiestrógenos, antiandrógenos, antiadrenérgicos, andrógenos, análogos liberadores de gonadotropinas.
 - b) **Complejos de Coordinación con Platino:** Actúan de forma semejante a los agentes alquilantes. Ej: cisplatino, y carboplatino.
 - c) **L-Asparaginasa:** Es una enzima que previene la síntesis de proteínas en células que necesitan de asparagina.
 - d) **Modificadores de la respuesta biológica:** Estos agentes alteran o aumentan la respuesta inmune del paciente hacia el tumor. Ej: anticuerpos monoclonales, interleucinas, interferones y levimisol (Leon Shargel, 1994).

La actividad de ciertas moléculas utilizadas en quimioterapia del cáncer, no es necesariamente antiproliferativa, para poder ser utilizado contra determinado tipo de cáncer. Tomado en cuenta el factor etiológico del cáncer de cérvix, el VPH existe la posibilidad de utilizar moléculas con actividad antiviral, lo cual indirectamente se aprovecharía para el tratamiento del cáncer de cérvix.

AGENTES ANTIVIRALES:

El desarrollo de compuestos para el tratamiento de enfermedades causadas por virus, ha sido más difícil, que el desarrollo de compuestos útiles para enfermedades causadas por microorganismos.

DEFINICION: Son agentes que alivian las enfermedades virales por su influencia sobre la replicación viral. Ya que los virus carecen de actividad metabólica y solo se replican en la célula huésped, los agentes antivirales generalmente lesionan a las células que albergan a los virus. Es por eso que solo se han introducido pocos agentes antivirales, la mayoría de los cuales son activos solo contra un virus.

Virus que contienen DNA: Muchos de los agentes dirigidos contra esta clase de virus, son virustáticos y detienen la síntesis de DNA por inhibición del DNA polimerasa.

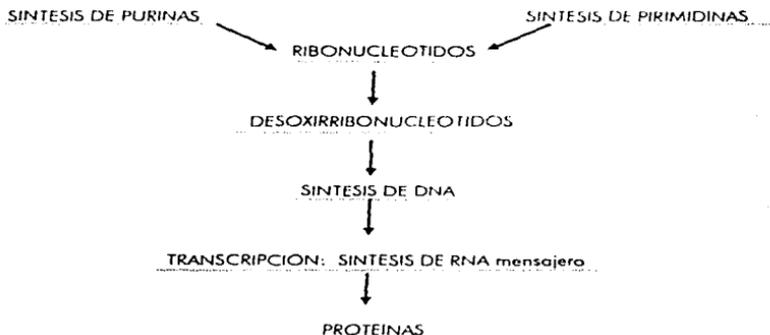
Virus que contienen RNA: Para este grupo de virus se utilizan agentes que inhiben a la enzima, transcriptasa reversa, estos agentes son virustáticos, y requieren tratamientos prolongados.

ALGUNOS AGENTES ANTIVIRALES Y SUS PRINCIPALES MECANISMOS DE ACCION

- **Aciclovir:** Análogo de nucleosido de purina, inhibe replicación viral. Es de los agentes menos tóxicos.
- **Amantadina:** Amina tríciclica útil contra la influenza, inhibe la replicación viral.
- **Ribavirina:** Análogo de un nucleosido, inhibe la síntesis de DNA y RNA, agotando las reservas intracelulares de nucleótidos, útil para tratamiento de la influenza A y B, y contra el virus sincicial respiratorio.
- **Vidarabina:** Análogo de adenosina útil en el tratamiento de infecciones por herpes virus. Inhibe la producción de virus, incorporándose al DNA viral.
- **Ganciclovir:** Análogo de nucleosido de purina útil para el tratamiento de infecciones con citomegalovirus. Se incorpora al DNA e inhibe a la DNA polimerasa viral.
- **Foscarnet:** Análogo de pirofosfato, inhibe directamente a enzimas que implicadas en la síntesis de DNA viral, sin incorporarse al DNA, es un agente con un amplio espectro.

- Zidovudina: Es un análogo a la timidina conocido como (AZT), es el medicamento de elección para pacientes con SIDA, inhibe a la transcriptasa reversa o impide la elongación del DNA.
- Dideoxinosina: Análogo de purinas, inhibe a la transcriptasa reversa, evitando la replicación del DNA, útil contra el HIV.
- Zalcitabina: Análogo de nucleosidos de pirimidinas, inhibe la transcriptasa reversa del HIV.

ESQUEMA DE POSIBLES MECANISMOS DE ACCION



La línea punteada indica donde podrían actuar los análogos de bases

Como se mencionó anteriormente encontramos que no hay agentes antivirales, específicos contra el virus de papiloma humano (VPH), por lo cual resulta necesaria la investigación sobre compuestos con potencial actividad contra el VPH.

El propósito de las moléculas de este estudio es ejercer una actividad antiviral con el fin de contribuir de manera indirecta contra el desarrollo del cáncer cérvico uterino.

VII. NUEVAS MOLECULAS DISEÑADAS COMO ANTIVIRALES

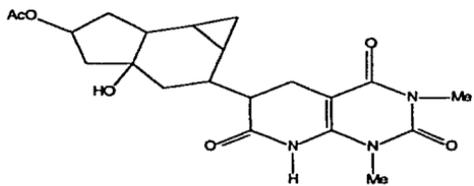
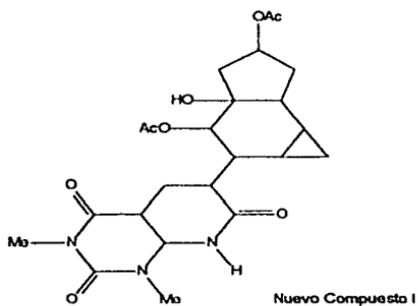
Uno de los mayores problemas que se presentan cuando los tumores son tratados con radioterapia o quimioterapia es la resistencia, por lo que el tratamiento de muchos tipos de cáncer resulta insatisfactorio, observándose después de cierto tiempo, recidiva de la enfermedad y presencia de tumor residual

Los fármacos que se administran, son generalmente combinaciones que actúan a través de diversos mecanismos y producen efectos colaterales que dañan al organismo. A pesar de que existen varios fármacos algunos como el 5FU o la Podofilina utilizados para tratamiento de infecciones con VPH, no son ni suficientes, ni 100% efectivos.

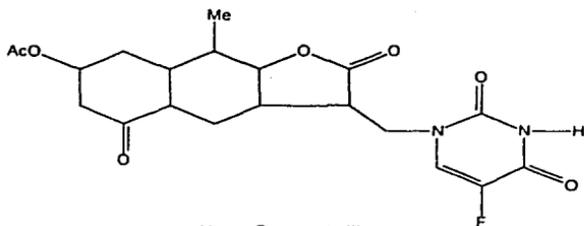
En este trabajo se probó la actividad biológica de cinco nuevas moléculas utilizando líneas celulares de cáncer de cérvix, que contienen el Virus de Papiloma Humano.

Estos fármacos fueron diseñados específicamente como antivirales(E. Díaz, H. Barrios, A. Quintero, J. Solano, 1997).

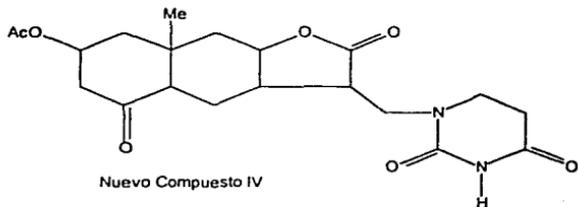
Las estructuras de los fármacos son las siguientes:



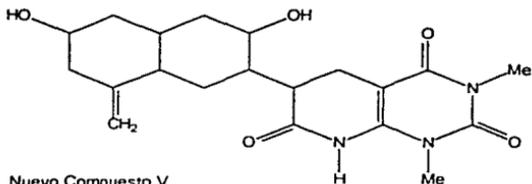
Nuevo Compuesto II



Nuevo Compuesto III



Nuevo Compuesto IV



Nuevo Compuesto V

CLAVES ASIGNADAS A LOS NUEVOS COMPUESTOS:

COMPUESTO	CLAVE
COMPUESTO 1	FI
COMPUESTO 2	FII
COMPUESTO 3	FIII
COMPUESTO 4	FIV
COMPUESTO 5	FV

COMPUESTO 1	CARACTERISTICAS
I	TRICICLO Y DOS GRUPOS ACETATO
II	TRICICLO Y GRUPO ACETATO
III	ATOMO DE FLUOR Y GRUPO LACTONA
IV	GRUPO LACTONA
V	GRUPOS HIDRÓXILO

VII. METODOLOGIA

Material para el cultivo de líneas celulares:

Medios de cultivo

- RPMI 1640 (adicionado con glutamina - GIBCO)

Suplementos:	g/l
NaHCO ₃	2g/l
Suero Fetal Bovino	10%
Antibiótico antimicótico	10ml
Piruvato de sodio (100mM)	10ml
Aminoácidos no esenciales (10mM)	10ml

- D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Media - GIBCO)

Suplementos	g/l
Glutamina (200mM)	2ml
Hepes	2.2ml
Antibiótico antimicótico	10ml
Aminoácidos no esenciales (10mM)	10ml
Suero Fetal Bovino	10%
NaHCO ₃	2g/l

Material para extracción de DNA

- Tripsina (1: 250)

Esta enzima se utiliza para favorecer que la monocapa de células se desprendan de la caja de cultivo.

- PBS (Buffer salino de fosfatos) Para 1L:

Este buffer es utilizado para lavar la monocapa de células y en algunos casos, para despegar éstas de la caja de cultivo.

- SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) al 20%

Este es un tensoactivo potente que facilita la disolución de las membranas celulares y por lo tanto la extracción del DNA.

- Proteinasa K 10mg/ml

Este reactivo es una proteasa (Tipo subtilisina) purificada del moho *Tritirachium album*. Tiene como función la degradación de proteínas de las células, se utiliza con EDTA para inhibir al Mg²⁺ dependiente de nucleasas. Temperatura útil entre 37 - 50°C.

- TEN (10-10-0.15) y TEN (10-10-0.65): Tris Cl (Tris Cl: Clorhidrato de (hidroximetil) aminometano) 10mM, EDTA 10mM, NaCl 0.15M y 0.65M.
- SEVAG (Cloroformo - Alcohol Isoamílico) 94.6 V/V%
El cloroformo elimina proteínas por desnaturalización y permite la separación de fases para la eliminación de éstas de la extracción de DNA. El alcohol isoamílico disminuye la producción de espuma durante la extracción.
- TE (Tris Cl - EDTA) pH 8
Solución que mantiene en condiciones adecuadas al DNA útil para su almacenamiento a -20°C.
- ETANOL ABSOLUTO
Utilizado para la precipitación del DNA
- FENOL pH 8
Utilizado para la eliminación de proteínas en la extracción de DNA.

Material para Electroforesis en gel para DNA y productos de PCR.

- AGAROSA (grado R. A.)
- BROMURO DE ETIDIO (10mg/ml)
Se usa para teñir material genético (DNA y RNA) en gels de electroforesis y poder observarlo con luz ultravioleta en el transiluminador.
- BUFFER DE CARGA PARA DNA
El buffer de carga tiene como función mantener la muestra al pH adecuado para su corrimiento, agregar un colorante que sirve para conocer el inicio de la corrida de la muestra pues los colorantes corren de ánodo a cátodo, al igual que el DNA.
- TBE
El TBE es un buffer de electroforesis que contiene las sales necesarias para mantener la fuerza iónica y pH adecuado para correr la electroforesis.

Material para la Extracción de RNA

- Alcohol Isopropílico
Utilizado para precipitar el RNA.
- Etanol al 75% con agua tratada con DEPC
Se utiliza para lavar la pastilla del RNA precipitado.

- Trizol (GIBCO)
Reactivo especial (contiene guanidina, urea y fenol) utilizado para la extracción de RNA.
- MOPS
Compuesto utilizado para preparar un buffer óptimo para el corrimiento de RNA en electroforesis en gel.
- Formamida
Se utiliza para desnaturalizar el RNA.
- Formaldehído
Se utiliza para desnaturalizar el RNA.

• MEZCLA DE CORRIMIENTO EN ELECTROFORESIS DE RNA

Concentración final

MOPS	1x
Formaldehído	6x
Formamida	50%
Bromuro de Etidio	0.5%
Loading Buffer	1x
Agua	

Lineas Celulares utilizadas

Todas las líneas celulares utilizadas son líneas tumorales de cáncer cérvico-uterino. Las líneas HeLa y C33 provienen del ATCC. VIPA, INBL y CALO son donaciones del Laboratorio de Biología Molecular de la FES Zaragoza (Dres.R. Rangel y B. Weiss).

LINEA	VPH	MEDIO DE CULTIVO
HeLa	VPH 18	D-MEM
Calo	VPH 18	D-MEM
INBL	VPH 18	D-MEM
C33	Sin VPH	D-MEM
VIPA	?	RPMI

LINEA CELULAR	DATOS CLINICOS DEL PACIENTE	CARCINOMA CLASIFICACION	SUBCULTIVO
VIPA	Sin Tratamiento	II B	Subcultivo: 8 meses
INBL	Sin Tratamiento. Edad: 45 años	IV B	Subcultivo: 2 años
CALO	Sin tratamiento Edad: 55 años	II B	Subcultivo: 2 años

SECUENCIA DE LA METODOLOGÍA

Este estudio se llevó a cabo en el siguiente orden:

- I. Cultivo de las líneas celulares CALO, VIPA, HeLa, INBL y C33 en los medios apropiados.
- II. Determinación de la presencia del Virus de Papiloma Humano (VPH) en la línea celular VIPA, mediante la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) del segmento L1 del genoma del VPH. Este segmento codifica para la principal proteína de cápside y es muy conservado entre los VPH por lo cual estos oligonucleótidos se usan para detectar la presencia de VPH en biopsias o células.
- III. Tipificación del VPH encontrado en la línea celular VPH mediante la amplificación por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos.
- IV. Cultivo de las líneas celulares y exposición a cinco fármacos de reciente síntesis. Estos nuevos compuestos son análogos de bases nitrogenadas y fueron diseñados como antivirales en el Instituto de Química por los Drs. Angel Guzmán y Eduardo Díaz. (E. Díaz, A. Guzmán A. Quintero, J. Solano, 1997)
- V. Evaluación de la posible actividad biológica de los nuevos compuestos sobre la replicación del DNA, en particular sobre el gen L1 del Virus de Papiloma Humano.
- VI. Evaluación de la posible actividad de los nuevos compuestos sobre la transcripción de la región L1 del virus.

METODOS

CULTIVO DE LINEAS CELULARES

El procedimiento debe realizarse lo más rápido posible, y bajo condiciones de esterilidad.

1. Adicionar 3ml de medio fresco a la caja de petri de plástico donde crecerán las células e incubarla 10 minutos a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad relativa.
2. Sacar los criotubos del nitrógeno líquido y descongelarlos en baño de agua a 37°C, hasta que el bloque de hielo se desprenda del criotubo.
3. Transferir cuidadosamente el contenido del criotubo a la caja de cultivo.
4. Incubar las células a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad relativa. Si el medio de congelamiento contenía DMSO se debe cambiar el medio de cultivo a las 2h pues el DMSO es tóxico para las células.
5. Cambiar el medio de cultivo con frecuencia. Generalmente es cada dos días, pero puede variar según la línea celular. En el caso de las líneas empleadas: CALO, VIPA, INBL, Hela, y C33 se les cambió el medio cada dos días.
6. Para cambiar el medio, se decanta el medio de cultivo con cuidado. Se adiciona 3ml de PBS-EDTA dejándolo caer por las paredes de la caja se enjuaga suavemente la superficie celular y se decanta. Se agregan 4-5 ml de medio de cultivo fresco, el cual debe estar a temperatura ambiente, y se debe agregar lentamente por las paredes de la caja.

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS

7. Una vez que las células llegaron a confluencia, hay dos opciones, resemarlarlas, o colectarlas para los fines a estudiar.
8. Para recolectar las células: se decanta el medio de cultivo se enjuaga la caja con 3ml de PBS-EDTA dos veces. Se añaden 2-3 ml de Tripsina y se incuba máximo 10 min. Una vez que se observa una película blanca, se saca esta suspensión con

pipetas pasteur estériles, y se coloca en tubos eppendorff estériles de 2 ml. Centrifugar a 5000 rpm 10-15 min y en la pastilla del sedimento disponemos del paquete celular.

9. En el caso de hacer resiembra para probar los nuevos compuestos: Se despegan las células de la caja de cultivo con ayuda de una pipeta pasteur succionando y regresando varias veces el medio hasta obtener un homogenado celular. Transferir este homogenado a un tubo falcon de plástico estéril de 100ml homogenizar nuevamente de manera suave con una pipeta graduada estéril. Tomar una alícuota de 100ul y colocar por ósmosis en la cámara de New Bauer la cual ya tenía colocado el cubreobjetos. Utilizando el microscopio con el objetivo 40x se cuenta el número de células en los cuadrantes correspondientes a los leucocitos (cuadrantes de los extremos con la cuadrícula más grande). Sacar un promedio del número de células de todos los cuadrantes contabilizados en una cámara. El número de células contenidas en el homogenado, corresponde al número promedio por un factor de 10^4 células/ml
10. Conociendo el número de células en suspensión se hacen las diluciones necesarias con medio fresco a 37°C, para obtener una concentración de 10^5 células/ml. Se inocula 1ml de este homogenado en cada caja para el posterior tratamiento con los compuestos a estudiar.

CONDICIONES

Para llevar a cabo el presente trabajo, las líneas celulares se mantuvieron bajo condiciones totalmente controladas, en incubadora con 5% de CO_2 , 100% de humedad relativa y a 37°C.

Se utilizó un grupo control de líneas celulares:

- a) Para la tipificación del VPH se utilizó como control positivo la línea HeLa (contiene al VPH 18) y como control negativo, la línea C33 (carece de VPH). Ambas son líneas de cáncer de cérvix.

- b) Para el tratamiento de los fármacos se utilizó un control de disolvente, el cual era cultivado al mismo tiempo, y bajo las mismas condiciones que las células bajo tratamiento.

FORMA DE TRABAJO.

Se formaron los grupos a tratar de la siguiente manera:

A un cultivo células en confluencia, se le resuspendió y se contabilizó el número de células por ml, como se mencionó anteriormente y a cada caja se le añadió un inóculo de 10^5 células y se les añadió el compuesto en estudio disuelto en DMSO, en un volumen máximo de 10ul a una concentración de 5uM, a las 0 y 48h

En cada sesión (aproximadamente 25 días) se trabajaba una línea celular la cual se mantenía en observación y bajo tratamiento. Terminada la etapa de tratamiento se procedía a la extracción de DNA. El DNA se almacenaba a -20°C y se realizaba la amplificación de la región en estudio entre 1 y 2 días después de la extracción del material genético, posteriormente el mismo día se llevaba a cabo el análisis por electroforesis de los productos amplificados.

En la siguiente sesión, se cultivaba otra línea celular, y se seguía el mismo procedimiento

Cuando se realizó hibridación Northern blot, las líneas se cultivaron, todas a la vez, se les dio tratamiento con los fármacos, al mismo tiempo y la extracción de RNA se llevó a cabo en una misma sesión. El RNA se almacenó a -70°C aproximadamente una semana antes de llevar a cabo la hibridación.

EXTRACCION DE DNA DE LINEAS CELULARES

Se debe observar la caja de cultivo con las células en confluencia, para obtener un buen rendimiento

1. Decantar el medio de cultivo.
2. Lavar la monocapa 2 veces con PBS frío (3-4ml) enjuagar y decantar.
3. Agregar 3ml de Tripsina a una concentración 1:250.

4. Incubar no más de 5 minutos o cuando se observe una película blanca, lo que indica que las células se están despegando.
5. Agregar 4-5 ml de medio de cultivo (D-MEM) para inactivar a la tripsina
6. Sacar con una pipeta pasteur estéril el medio y distribuir en tubos eppendorfs de 2ml
7. Centrifugar 5 minutos a 10 000 rpm.
8. Decantar el sobrenadante o eliminarlo con pipeta pasteur.
9. Resuspender la pastilla en 500ul de TEN 10-10-0.15 frío.
10. Agregar 5ul de proteinasa K (10mg/ml) de tal manera que tengamos una concentración final de 0,2mg/mL.
11. Agregar 12.5ul de SDS al 20% de tal forma que la concentración final sea de 0.5%.
12. Mover el tubo varias veces y con cuidado, se observará que la suspensión se torna viscosa.
13. Incubar de 1-2 h en un baño de agua a 50°C hasta aumentar esa apariencia viscosa.
14. Sacar del baño y mantener en hielo.
15. Añadir 500ml de TEN 10-10-0.65 y homogeneizar volteando cuidadosamente el tubo.
16. Redistribuir en tubos eppendorf dejando espacio para agregar 1ml de Fenol-Cloroformo (1:1)
17. Mezclar bien volteando varias veces el tubo centrifugar máximo 5 minutos a hasta separación de las fases, a 5000 rpm.
18. Transferir la fase acuosa a otro tubo y repetir el paso anterior.
19. A la fase acuosa, se le añade 1ml de Sevag mezclar bien volteando el tubo o si es necesario se homogeneiza en el vórtex a baja velocidad. Centrifugar máximo 5 minutos o hasta separación de fases a 5000 rpm.
20. Transferir la fase acuosa a otro tubo y añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto. Mezclar bien volteando el tubo varias veces, se puede observar que empieza a precipitar una fibra blanca. Se deja a 4°C todo el fin de semana.
21. Se centrifuga 15 minutos a 14 000 rpm. Se elimina la fase etanólica.

22. Para eliminar los residuos de fase acuosa se colocan los tubos eppendorf en el desecador tapados con parafilm aproximadamente 30 minutos.
23. Se resuspende la pastilla de DNA en TE pH 8 entre 50 y 400 μ l.
24. Si se sospecha que aún quedan residuos de fenol o cloroformo se puede llevar a cabo una extracción con éter y repetir el paso 22 y 23.
25. Se cuantifica la cantidad de DNA en un espectrofotómetro, a 260 y 280 nm. La relación 260/280 da una idea de la pureza del DNA.

Una vez que se cuenta con el DNA de todas las muestras de las líneas celulares, se corre 1 μ g en un gel de Agarosa al 0.6% para determinar si el material genético, no está degradado o contaminado.

Posteriormente se hacen las diluciones necesarias para tener una concentración de 100 ng/ μ l, y se procede a la Amplificación por PCR.

TÉCNICA DE PCR

FUNDAMENTO: La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método *in vitro* para la síntesis enzimática de secuencias específicas de DNA empleando dos cebadores (oligonucleótidos) que hibridan, en el extremo 3' a las dos cadenas complementarias de DNA que limitan la región de interés del DNA blanco. Una serie repetitiva de ciclos que involucran la desnaturalización del DNA molde, unión con el cebador, y la elongación de los cebadores unidos por medio de la DNA polimerasa resulta en la acumulación exponencial del fragmento específico cuyo término está marcado por los extremos 5' de los cebadores. Ya que los productos sintetizados por la extensión de los cebadores en un ciclo puede servir como DNA molde en el siguiente, el número de copias de DNA sintetizado es 2^n donde n es el número de ciclos. El fragmento de DNA sintetizado generalmente posee de 50 a 2 500 nucleótidos.

Cada ciclo de amplificación consta de las siguientes etapas:

- a) **Desnaturalización:** La doble hélice de DNA se calienta a 94°C, lo que permite romper los puentes de hidrógeno existentes entre las bases de las dos hebras, generalmente 15-30 segundos
- b) **Unión de los Cebadores:** La temperatura se disminuye hasta aproximadamente 50°C en presencia de los cebadores. Entonces estos se unen específicamente a los extremos de la región a amplificar, cada uno en la hebra que le corresponde. Generalmente tarda de 20 a 30 segundos.
- c) **Elongación:** La temperatura se eleva a 72°C, la DNA polimerasa alarga las nuevas hebras de DNA a partir de los cebadores, uniendo nucleótidos trifosfato (dTTP, dATP, dCTP, dGTP.). Tarda de 30 a 90 segundos.

Componentes de Reacción:

Componente	Volumen Recomendado
DNA muestra	10 ² -10 ³ moléculas *
Cebadores	0.25 ml
DNA Taq polimerasa	2.5 unidades
dNTPs	200 mM c/u

1 μ g de DNA genómico humano de copia sencilla equivale a 3×10^3 moléculas blanco.

Para la amplificación de la región L₁ se utilizaron los siguientes cebadores:

MY09 Cebador sentido: CGTCCMARRGGAWACTIGATC

MY11 Cebador antisentido: GCMCAGGGWCATAAAYAATGG

M = A + C R = A + G W = A + T Y = C + T (Michele Manos, 1990)

Estos cebadores u oligonucleótidos son específicos para amplificar la región que pertenece al marco abierto de lectura del genoma viral: L₁, la cual codifica para la principal proteína de la cápside y está muy conservada entre los diferentes VPH (David O. White, 1994).

El producto de amplificación que generan estos cebadores es de aproximadamente 450pb.

Se utilizó un control positivo: Hela que se sabe presenta VPH y un control negativo: C33 que no presenta VPH.

PROTOCOLO PARA UNA REACCION:

REACTIVO	VOLUMEN ul
DNA	2ul (200ng)
Cebador MY09	0.4ul
Cebador MY11	0.4ul
Taq. polimerasa	0.2ul (1 unidad)
Amortiguador de PCR	1ul
Mezcla de dNTPs	0.8ul
Agua (DEP)*	6.2ul

- Mezcla de dNTPs: Se mezclan 4ul de cada uno de los cuatro desoxirribonucleótidos: dTTP, dATP, dCTP, dGTP.

PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN DE LA REGION L, DEL HPV

PROCESO	TEMPERATURA Y TIEMPO
Desnaturalización	95°C 30 seg.
Alineación	55°C 30 seg.
Extensión	72°C 1min.
No. de ciclos	30

Una vez que se detectó la presencia del VPH en las diferentes líneas de cáncer cérvico uterino, se procedió a determinar el tipo de VPH que presentaba cada una de las líneas. Ya que los VPH 16 y 18 son los que con mayor frecuencia se presentan en cáncer cérvico uterino, se eligieron oligonucleótidos específicos para los VPH 18 y 16. Los productos de amplificación que resultan con estos cebadores es de aproximadamente 360pb.

Oligonucleótidos para VPH 18 y para VPH 16 pertenecen a la región URR (Upstream Regulatory Region) y son específicos para cada tipo de VPH.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

PROGRAMA DE AMPLIFICACION PARA LA REGION ESPECIFICA DE VPH 16 Y 18

PROCESO	TEMPERATURA Y TIEMPO
Desnaturalización	94°C 30 seg
Alineación	54°C 30 seg
Elongación	72°C 30 seg
No. de ciclos	36 ciclos
Ultimo ciclo	72°C 10 min

PROTOCOLO PARA UNA REACCION (PARA VPH 16 Y 18)

REACTIVO	VOLUMEN mL
Amariguador de PCR	1ul
MgCl ₂ 25mM	0.8ul
Cebador antisentido	0.5ul
Cebador sentido	0.5ul
Mezcla de dNTPs	0.8ul
Agua (DEP)	4.2ul
Taq polimerasa	0.2ul (1 unidad)
DNA	2ul (200ng)

ANALISIS DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACION

1. Los productos de amplificación se analizan mediante electroforesis en gel de agarosa:
 2. Se toma una alícuota de: 10ul de la mezcla de reacción de amplificación
 3. Se le añaden 2ul de Buffer de carga para DNA
 4. Se corren en un gel de agarosa al 1.5% que contiene bromuro de etidio al 0.5%.
 5. Junto con las muestras se corre una muestra de un marcador de peso molecular para determinar aproximadamente el peso de la región amplificada.
- * Nota: Todo el material y el agua utilizada fue tratada con DEP con el fin de eliminar toda enzima capaz de degradar el DNA.

PROCEDIMIENTO PARA EVALUAR LA POSIBLE ACTIVIDAD
BIOLOGICA DE LOS NUEVOS COMPUESTOS

Fármacos: Se utilizaron los fármacos I, II, III, IV, y V mostrados anteriormente.

1. Se tienen cultivos en confluencia de las siguientes líneas celulares:

- a) VIPA
- b) CALO
- c) INBL

2. Se decanta el medio de cultivo y para las líneas CALO e INBL se despegan las células con ayuda de Tripsina en el caso de la línea VIPA las células se despegan con PBS-EDTA. La exposición a la enzima no debe ser mayor a 10 minutos, ya que las células pueden dañarse.
3. Se inactiva a la tripsina agregando medio de cultivo y se homogeneiza la suspensión celular pasándola varias veces por una pipeta pasteur.
4. Se toma una alícuota de esta suspensión y se cuenta el número de células en el microscopio, con ayuda de una cámara de New Bauer (Tomando en cuenta que multiplicando el promedio de las células encontradas en los cuatro cuadrantes por un factor de 100 000 se obtiene el número de células por ml).
5. A partir de esta consideración se coloca un inóculo de 1×10^5 células en cajas de cultivo de 10 cm de diámetro.
6. Se preparan diluciones de los fármacos I, II, III, IV, y V los cuales están disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) de tal forma que se agregue a cada caja una concentración de 2 μ M del fármaco en un volumen no mayor a 10 μ l de DMSO (ya que la concentración tóxica del DMSO para líneas celulares es del 5%).
7. A las células se les añade el fármaco a las 0 h, 24 h y 48 h se observan los posibles cambios morfológicos hasta las 96 h.
8. A las 96 h a las células se les decanta el medio de cultivo. Y se extrae su DNA.
9. El experimento se repite, pero en esta ocasión se extrae el RNA de las células.

EXTRACCION DE RNA

1. Una vez cultivadas las células y tratadas con los diferentes fármacos, se decanta el medio de cultivo. Se lavan las células con PBS 2 veces.
2. Lisar las células directamente en la caja de cultivo, añadiendo 1 ml de Trizol.
3. Pasar el lisado varias veces por una pipeta pasteur, tal que se forme un homogenado.
4. Transferir el homogenado a varios tubos eppendorf
5. Incubar el homogenado a temperatura ambiente para favorecer la disociación de complejos núcleo proteicos.
6. Añadir 200ul de cloroformo. Agitar los tubos 30 segundos, mantener en hielo.
7. Centrifugar a 14 000 rpm durante 25 minutos a 4°C.
8. Se observa que aparecen tres fases en los tubos la superior es la acuosa donde se encuentra el RNA. La interfase es delgada y junto con la inferior compuesta por disolventes orgánicos, contiene al DNA y proteínas.
9. Transferir la fase acuosa a un tubo eppendorf. Agregar un volumen igual de Isopropanol. Mezclar suavemente
10. Mantener a 4°C todo un fin de semana, o al menos toda la noche.
11. Centrifugar 30 minutos a 14 000 rpm a 4°C.
12. Se observa una pastilla amarillenta en el fondo del tubo. Remover el sobrenadante.
13. Lavar la pastilla, añadiendo 100ul de Etanol DEPC al 75%.
14. Lavar la pastilla, añadiendo 100ul de Etanol absoluto

PREPARACION DE LA SONDA

1. Se lleva a cabo la amplificación de la región L1 mediante la técnica de PCR. Con el programa de amplificación para este gen.
2. Se corre el producto de amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, con un marcador de peso molecular
3. Se observa en el transiluminador, para verificar que es la banda que se busca.
4. Se corta la banda y se purifica el DNA mediante electroelución.

5. Se lava el DNA obtenido siguiendo la metodología de extracción de DNA desde el paso 16.
6. Se marca la sonda con dCTP* radiactivo (P^{32}) en el momento de llevar a cabo la hibridación.

HIBRIDACION NORTHERN BLOT

1. Se migra en un gel de electroforesis los RNAs de las líneas celulares tratadas con los nuevos compuestos de la siguiente manera:
 - a) En un tubo eppendorf se colocan 20 μ g de RNA en un volumen aproximado de 7 μ l.
 - b) Se añaden 27 μ l de la mezcla de corrimiento de RNA.
 - c) Se colocan a 85°C por 5 minutos.
 - d) Se colocan 5 minutos en hielo.
 - e) Se colocan en el gel y se corre la electroforesis.
2. Observar después de la electroforesis, el gel en el transiluminador, para verificar que el material genético no está degradado y se observan los fragmentos de RNA ribosomal 28s, 18s y 5s.
3. Lavar el gel 2 veces con agua estéril y tratada con DEPC 5 minutos con agitación ligera.
4. Sumergir el gel en una solución de NaOH 50 mM y 10 mM NaCl durante 15 minutos.
5. Neutralizar colocando el gel en una solución de TRIS-HCl 0.1M pH 7.5 durante 30 minutos con agitación ligera.
6. Lavar el gel en SSC 20 X por 30 minutos.
7. Identificar y marcar la orientación del gel, de tal forma que se sepa cual es el derecho y el revés así como el inicio y la posición de los RNAs.
8. Cortar una pieza de membrana de transferencia (Zetabind) del mismo tamaño del gel, sumergirla 30 minutos en agua. Sumergirla 8 minutos en SSC 10 x.
9. Poner en contacto el gel con la membrana toda la noche en SSC 20X a 4°C.

10. Colocar encima de la membrana 3 papeles filtro Whatman previamente cortados del tamaño de la membrana y sumergidos en SSC 10x. Colocar
11. Colocar encima tres papeles filtro Whatman secos. Sobre estos se coloca aproximadamente 30 cuadros de toalla de papel o servilletas. Conforme se humedezcan las toallas de papel se cambian por secas.
12. Remover la membrana del gel guardar la membrana sin dejarla secar en una bolsa especial.
13. Irradiar con luz UV hasta 8 minutos en el crosslinker.
14. Guardar la membrana se guarda en el refrigerador a 4°C, en una bolsa de plástico.
15. Lavar la membrana con SSC 0.1x
Preparar el buffer de hibridación el cual se prepara en el momento de usarse. Se preparan 0.2ml por cada cm² de membrana a prehibridar. El amortiguador está constituido por:

• BUFFER DE PREHIBRIDACIÓN DE RNA

	Concentración Final
SSC 20x	2x
Sol. Denhart 50x	4x
SDS 10%	0.2%
DNA de esperma de arenque	100 ug/ml
Agua	c. b. p.
Formamida	40%
NaPO ₄ 2M pH 6.5	

El DNA de esperma de salmón se disuelve en 1 ml de agua estéril tratado con DEPC y se calienta a 100°C 5 minutos. Se coloca en hielo 5 minutos y después se agrega a la mezcla.

Calentar la mezcla 10 minutos a 50-60°C. Enfriar hasta 37°C.

16. Colocar el buffer en un tubo rotatorio y colocar dentro la membrana, evitar que se formen burbujas y asegurar que el buffer cubra toda la membrana.
17. Prehibridar 6h a 37°C en los tubos rotatorios

18. Marcar la sonda con [α - 32 P] dCTP por el método de Random Primers. Para lo cual se prepara la siguiente mezcla:

- | | |
|------------------------------------|-------------|
| • DNA de la sonda | 100ng |
| • Mezcla de iniciadores aleatorios | 15ul |
| • dATP | 2ul |
| • dGTP | 2ul |
| • dTTP | 2ul |
| • [α - 32 P] dCTP | 4ul |
| • Fragmento Klenow | 1ul |
| • Agua | c.b.p. 50ul |

19. Se mezcla el DNA de la sonda con el agua y se calienta a 100°C 5 minutos.

Posteriormente se coloca en hielo.

20. Agregar la mezcla de iniciadores aleatorios, después se añaden los nucleótidos trifosfato y se mezcla bien.

21. Añadir Sul de la sonda marcada radioactivamente. Esta operación se lleva a cabo en la campana con protección a través de una pantalla de acrílico

22. Agregar el fragmento Klenow y mezclar. Incubar en un baño de agua a 42°C por media hora.

23. Mientras se prepara una columna de Sephadex G-50. Se improvisa la columna con una jeringa de insulina. Se elimina la aguja y se tapa el fondo con fibra de vidrio. Añadir el sephadex. Centrifugar la columna a 3000 rpm 1 minuto para retirar el líquido.

24. Al finalizar la media hora, colocar la mezcla dentro de la columna de Sephadex, y esto a su vez dentro de un tubo eppendorf donde se recibirá la sonda purificada. Centrifugar la columna a 3000 rpm 1 minuto. Comprobar con el contador que la sonda queda marcada.

Hervir la sonda 5 minutos y añadirla al buffer de hibridación que contiene:

Dextran sulfato 50%	2.0ml
SSC 20x	2x
Sol. Denhart 50x	4x
SDS 10%	0.2%
DNA de esperma de arenque	100 ug/ml
Agua	c.b.p.

Formamida
NaPO₄ 2M pH 6.5

40%

25. Detener la prehibridación se elimina el buffer de prehibridación y se le agrega el buffer de hibridación.
26. Hibridar toda la noche a 42°C.
27. Eliminar el buffer de manera adecuada y sacar la membrana.
28. Lavar la membrana en SSC 2x por 30 minutos. Eliminar el exceso de agua .
29. Lavar la membrana en SSC 2x nuevo por otros 30 minutos.
30. Lavar la membrana en una solución con SSC 0.1x + SDS 0.1% con agitación moderada a 60°C. durante 30 minutos.
31. Sacar la membrana y verificar si la radiactividad está presente de manera inespecifica es decir por toda la membrana. Si es así repetir los lavados.
32. Se coloca la membrana en una bolsa de plástico.
33. Exponer la membrana en película X-AR a -20°C dentro de un cassette con pantallas intensificadoras. Envolver en una bolsa negra para evitar que la luz vea la placa.
34. Revelar la placa después de 72 h.

VIII. RESULTADOS

I. CARACTERIZACION DE LA LINEA CELULAR VIPA

DETECCION DEL VIRUS DE PAPILOMA HUMANO

Con el objeto de conocer si la línea VIPA contiene el Virus de Papiloma (VPH), se efectuaron experimentos utilizando el DNA aislado de la línea. Se amplificó por PCR, con oligonucleótidos específicos el gen de la región L1 que codifica para una proteína conservada entre los VPHs. La amplificación de esta proteína se utilizó para detectar la presencia del VPH en biopsias (Allison P. Cullen, 1991).

Los datos de la expresión de L1 en las diferentes líneas se encuentran en la Figura 1. Las líneas CALO e INBL son confirmaciones de una comunicación personal (IB Dr. A. García Carrancá). La banda tiene un peso molecular aproximado de 450 p.b. La línea celular HeLa se utilizó como control positivo, C33 como control negativo. En INBL y CALO se confirmó la presencia de este virus.

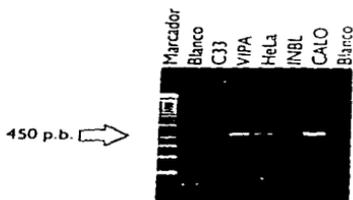


FIG. 1 Detección de la Banda del gen de L1 del Virus de Papiloma en la línea VIPA.

Como se observa en la figura la línea celular VIPA presenta la región que codifica para L1, por lo tanto contiene el VPH.

TIPIFICACION DEL VIRUS DE PAPILOMA ENCONTRADO EN LA LINEA VIPA

Con el propósito de determinar que tipo de VPH contiene la línea celular VIPA, se llevaron a cabo otros experimentos de amplificación, con oligonucleótidos específicos para detectar, por un lado al VPH 16 y por otro al VPH 18. No hubo amplificación con los oligonucleótidos para VPH 16. La amplificación para el VPH 18 da como resultado una banda de 360pb. Aproximadamente. Los resultados se muestran en la Figura 2. La línea celular HeLa se utilizó como control positivo. En INBL y CALO se confirmó la presencia de este tipo de virus.

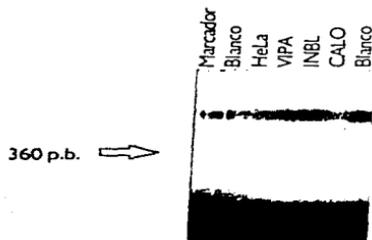


FIG.2 Tipificación de Virus de Papiloma Humano.

Como se observa en la figura 2, la línea celular VIPA presenta el Virus de Papiloma Humano tipo 18.

II. EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS NUEVOS COMPUESTOS

La segunda parte de este estudio consistió en probar la actividad biológica de 5 nuevos compuestos diseñados como antivirales. Para ello se cultivaron las células, se añadió el compuesto a las 0, 24, 48, y 72 h

Se mantienen en observación y se detectan los posibles cambios morfológicos.

Estos 5 compuestos ya habían sido evaluados como agentes antiproliferativos (QFB J. Solano) por medio de la técnica del MTT. Estos compuestos no inhibieron la proliferación de manera significativa.

Sin embargo, los compuestos fueron diseñados como antivirales, por lo que se decidió probar su posible actividad biológica a nivel molecular.

Hay que considerar que las líneas celulares están constituidas en su mayoría por células con VPH, pero hay una fracción que puede carecer del virus, ya que las células no fueron clonadas.

OBSERVACIONES MICROSCÓPICAS DE LAS LÍNEAS CELULARES DURANTE EL TIEMPO DE EXPOSICIÓN A LOS NUEVOS COMPUESTOS

LINEA CELULAR CALO

Las células de esta línea crecen pegadas a la superficie plástica de la caja de cultivo, son alargadas en cuatro extremos. Forman grupos de 12 a 18 células. Con un crecimiento de 24 h parece que se fusionan unas con otras y parecen como pequeñas neuronas que se alargan, con el tiempo, pierden esta forma, adquiriendo un agrupamiento más delineado. Sin embargo parece que a comparación de la línea celular VIPA esta línea tarda más para crecer en confluencia.

CONTROL DE DISOLVENTE (DMSO) <5%V/V

- Entre las 24 y 48 h se observó que las células comenzaban a formar grupos pequeños de hasta 8 células. Se alcanzó una confluencia máxima de 40%.
- Entre las 72 y 96 h no se observaron células vacuolizadas. Los grupos celulares no son muy grandes, pero se encuentran bien definidos. Se presentaron algunas células alargadas de mayor tamaño.

COMPUESTO 1 (F1) Conc. 2uM

- Entre las 24 y 48 h adquirieron su forma, se adhieren a la superficie y lograron una confluencia entre el 45 y 50%. Se observó su interior un poco más oscuro de lo normal. Se observó un número elevado de muertas.
- Entre las 72 y 96 h las células se alargaron mucho, los grupos ya no están compactados. No se observó aumento de confluencia esta permaneció prácticamente en 50%. Se observó que existían residuos internos muy oscuros vacuolizados.

COMPUESTO 2 (F2) Conc. 2uM

- Entre las 24 y 48 h las células se adhieron a la superficie de la caja, y lograron una confluencia entre 50 y 60%. Sin embargo en este caso se observó el interior celular al parecer vacuolizado y más oscuro que en el caso del compuesto 1.
- Entre las 72 y 96 h se observó un cambio constante en los bordes celulares, los cuales se tornaron muy irregulares y alargados. Los grupos formados, estaban poco definidos. Y se obtuvo una confluencia de 55 a 60%.

COMPUESTO 3 (F3) Conc. 2uM

- Entre las 24 y 48 h las células lograron una confluencia del 50% con interior celular oscuro, sin exceder al presentado en las células tratadas con el compuesto II.
- Entre las 72 y 96 h se intensificaron las vacuolas internas la confluencia permaneció constante y se encontraron células redondas.

COMPUESTO 4 (F4) Conc. 2uM

- Entre las 24 y 48 h se encontraron grupos celulares mucho más grandes que en las otras cajas o el control. Se alcanzó una confluencia del 50%. Sin embargo aparecieron muchas muertas a las 48 h.
- Entre las 72 y 96 h la confluencia permaneció constante. Se encontraron células más grandes de lo normal. No se observaron claramente los límites celulares y parecen formar una masa celular. También se encontraron células alargadas formando grupos poco definidos.

COMPUESTO 5 (F5) Conc. 2 μ M

- Entre las 24 y 48 h se alcanzó una confluencia del 50%. Se notó que había un poco más de células muertas que con respecto al control. Se observaron grupos de células grandes y más alargadas.
- Entre las 72 y 96 h las células se alargaron mucho, los grupos se extendieron. La confluencia no varió se mantuvo en 50%. Se hicieron notar las células con citoplasma oscurecido, al parecer también vacuolizadas.

LINEA CELULAR VIPA:

Las células en condiciones normales son esféricas y ovals alargadas al observarlas en el microscopio parece que la membrana (su límite con el medio de cultivo) no está bien definida en todos sus puntos y da la impresión de que esta abierta. Estos bordes se adaptan a los bordes de las demás células formando grupos cuya forma es compacta y variada. Crecen adheridas al plástico de la caja de cultivo.

En general en línea se agrupa en conjuntos de 2 a 12 células aproximadamente hasta que llegan a confluencia. En cuanto a su morfología crecen como delgadas agujas adheridas a la base de la caja de cultivo, tienen bordes poco definidos que se adaptan a los límites de las otras células del conjunto. Si no se les cambia el medio las células alcanzan confluencia de casi el 100% a las 96h, después de las cuales el cultivo comienza a envejecer pues el número de células muertas, aumenta considerablemente.

CONTROL DE DISOLVENTE (DIMETIL-SULFÓXIDO DMSO) <5%

- Entre las 24 y 48 h aumentan poco en número y se encuentran formando grupos de 8 a 12 células. Sus bordes están poco definidos.
- A las 72 h aumenta considerablemente el número de células, la confluencia llega a ser de hasta el 85%. Hay pocas células muertas en el medio.
- A las 96 h la caja tienen una confluencia de aproximadamente 90%. Las células conservan su morfología original y hay pocas muertas.

COMPUESTO 1 (F1) Conc. 2uM

- Entre las 24 y 48 h aumentaron casi al doble en número. Conservan su morfología respecto al control y hay algunas muertas.
- A las 72 h aumentan en número, existe una confluencia entre el 75 y 80%. Conservan su forma.
- A las 96 h el crecimiento se detuvo y hay menor cantidad que en el control. El número de muertas es mayor la confluencia se mantuvo igual que a las 72 h. Su morfología es la misma respecto al control.

COMPUESTO 2 (F2) Conc. 2uM

- Entre las 24 y 48 h las células aumentaron en número al doble. La morfología es la misma y se encuentran pocas muertas.
- A las 72 h aumentó poco el crecimiento la confluencia es del 70% máximo. Conservan su morfología. Parece que hay células por nacer.
- A las 96 h aumentó considerablemente el número de células muertas. Pero alcanza una confluencia parecida a la del control, del 85-90%.

COMPUESTO 3 (F3) Conc. 2uM

- Entre las 24 y 48 h las células aumentaron en número al doble. La morfología es la misma y se encuentran pocas muertas.
- A las 72 h el crecimiento respecto al día anterior es muy pobre. Al parecer hay células por nacer.
- A las 96 h aumentó drásticamente el número de muertas, pero aumentó el crecimiento aún más que en el control. Hasta llegar a una confluencia de 95%.

COMPUESTO 4 (F4) Conc. 2uM

- Entre las 24 y 48 h las células aumentaron en número al doble. La morfología es la misma y se encuentran pocas muertas. Las células son más grandes que las normales. A las 48h las células estaban más diferenciadas, había muy pocas células esféricas que son la forma que adoptan inicialmente o cuando ya mueren.
- A las 72 h aumentó considerablemente el crecimiento hasta llegar a una confluencia del 90%. Comienzan a morir.
- A las 96 h aumentó el número de muertas y el crecimiento llega hasta el 90% de confluencia. Conservan su morfología.

COMPUESTO 5 (F5) Conc. 2uM

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Entre las 24 y 48 h las células aumentaron en número al doble. La morfología es la misma y se encuentran pocas muertas. Aproximadamente el 20% de las células presentan material interno de color más oscuro. • A las 72 h hubo poco crecimiento con respecto al día anterior. Llegaron a una confluencia del 60-70%. Algunas comienzan a morir. • A las 96 h el número de células muertas fue bajo, llegaron a una confluencia del 90%. |
|--|

LINEA CELULAR INBL

Esta línea celular crece en condiciones normales en formas geométricas, alcanzan una confluencia del 100 a las 96 h, incluso antes. Después de las 96 h comienzan a morir drásticamente si no se les cambia el medio de cultivo

CONTROL DE DISOLVENTE DMSO (<5% V/V)
--

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • Entre las 24 y 48 h aumentan poco en número y se encuentran formando grupos de 8 a 12 células. Sus bordes están poco definidos. • A las 72 h aumento considerablemente el número de células, la confluencia llega a ser de hasta el 85%. Hay pocas células muertas en el medio. • A las 96 h la confluencia es del 85-90%. Aumenta el número de muertas. Las células se alargaron. Algunas conservan su forma geométrica. |
|---|

COMPUESTO 1 (F1) Conc. 2uM

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> • Entre las 24 y 48 h aumentaron casi al doble en número. Conservan su morfología respecto al control y hay algunas muertas. • A las 72 h aumentan en número, existe una confluencia mayor. Conservan su forma. • A las 96 h hay bastantes muertas aunque la confluencia aumenta hasta el 70%. En realidad hay pocas células con su forma original geométrica, la mayoría son redondas y alargadas. Muchas tienen material interno oscuro. |
|--|

COMPUESTO 2 (F2) Conc. 2 μ M

- Entre las 24 y 48 h las células aumentaron en número al doble. La morfología es la misma y se encuentran pocas muertas.
- A las 72 h aumento poco el crecimiento la confluencia es del 70% máximo. Conservan su morfología. Parece que hay células por nacer.
- A las 96 h presentan formas geométricas, principalmente triangulares. Existen muchas muertas flotando, otras dañadas. Alcanzan una confluencia de 75%.

COMPUESTO 3 (F3) Conc. 2 μ M

- Entre las 24 y 48 h las células aumentaron en número al doble. La morfología es la misma y se encuentran pocas muertas.
- A las 72 h el crecimiento es considerable.
- A las 96 h la confluencia es del 60-70%, existen algunas células muertas flotando y otras maltratadas de forma irregular y oscuras.

COMPUESTO 4 (F4) Conc. 2 μ M

- Entre las 24 y 48 h las células aumentaron en número al doble. La morfología es la misma y se encuentran pocas muertas.
- A las 72 h aumentó el crecimiento hasta llegar a una confluencia del 70%. Comienzan a morir.
- A las 96 h aumentó el número de muertas y el crecimiento llega hasta el 75% de confluencia. Algunas están muy alargadas con bordes indefinidos.

COMPUESTO 5 (F5) Conc. 2 μ M

- Entre las 24 y 48 h las células aumentaron en número al doble. La morfología es la misma y se encuentran pocas muertas. Algunas células presentan material interno de color más oscuro.
- A las 72 h hubo poco crecimiento. Llegaron a una confluencia del 70%. Aparecen algunas muertas flotando.
- A las 96 h el número de células muertas aumento, llegaron a una confluencia del 85%. Presentan el interior más oscuro.

En general el 20% de las células descritas anteriormente presentaron vacuolización interna oscureciendo el citoplasma. Y solo en muy pocos casos VIPA. De forma global VIPA tuvo mayor confluencia que INBL.

Como podemos analizar en las tres tablas de resultados las líneas celulares CALO, INBL y VIPA tienen comportamientos diferentes entre sí cuando son expuestas a los fármacos, no hay similitudes contundentes que semejen a una línea con otra. Sin embargo podemos destacar que en general para los fármacos 3 y 5 las líneas celulares VIPA e INBL mostraron una detención del crecimiento a las 48h que se reanudaba posteriormente para alcanzar el mismo porcentaje de confluencia que el control, hacia las 96h.

Podemos señalar también que en los casos de las líneas INBL y CALO a partir de las 48h se observaban manchas oscuras en el interior celular en las células tratadas con los fármacos mientras que el control permanecía normal. Fue interesante notar que estas manchas se observaron principalmente en las líneas CALO e INBL, mientras que VIPA no presentó esta obscuridad intracelular. También se observó que las células a veces se alejaban de su morfología normal, sobretudo después de las 72 h. En el caso de la línea celular CALO la confluencia máxima alcanzada fue del 60-70% en las células tratadas, pero esto también se observó en la caja control, con lo que descartamos la posibilidad de que los fármacos estén afectando su crecimiento, sino que en este caso pueden considerarse condiciones de mantenimiento lo que afectó que llegaran a una confluencia tan pobre a las 96 h.

EVALUACION DE LA POSIBLE ACTIVIDAD DE LOS NUEVOS COMPUESTOS SOBRE LA REPLICACION VIRAL DE LA REGION LI

Esto se lleva a cabo exponiendo las células a los fármacos, seguido de la extracción de DNA y la posterior amplificación de la región LI del virus para determinar si los fármacos podían disminuir o inhibir la replicación lo cual sería detectado por la disminución de la intensidad o desaparición de las bandas de amplificación. Con el propósito de tener una idea cuantitativa de cuanto había sido la disminución de la replicación se llevó a cabo una amplificación preliminar con diferentes cantidades de DNA genómico celular en orden decreciente, para poder comparar el orden de

disminución o aumento, de la presencia del gen viral amplificado después del tratamiento. En estos experimentos se utilizó como control negativo, es decir que no presenta VPH la línea celular tumoral de cáncer de cérvix C33. Como control positivo se utilizó la línea celular tumoral de cáncer de cérvix Heta la cual tiene integrada en su genoma el VPH 18 (ATCC, 1990).

Si los fármacos tienen un efecto negativo (inhibición) sobre la replicación de esta región viral, habrá menor cantidad de DNA del gen que codifica para L1 en los mismos 200ng agregados a la mezcla de reacción es decir habrá una dilución del genoma viral, por lo cual si existe algún efecto inhibitorio observaremos menor amplificación de la región L1 con respecto al control. Esto será indicado por una menor intensidad de la banda, por el contrario si el efecto es positivo sobre la replicación observaremos mayor intensidad de la banda amplificada con respecto al control.

Los resultados de la actividad biológica sobre la replicación viral se observan en las figuras 5, 6 y 7 para las líneas celulares C410, VPA e H121, respectivamente.

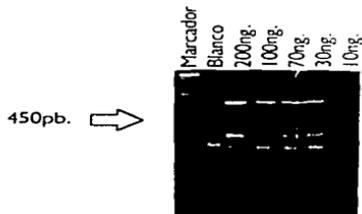


FIG.3 Amplificación de la Región L1 colocando diferentes cantidades de DNA en orden progresivo.

Observación de aumento de la intensidad de la Banda conforme aumenta la cantidad de DNA añadido. Esto tiene la finalidad de mostrar que la técnica de PCR puede ser cuantitativa.

EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA REPLICACION VIRAL:
LINEA CELULAR CALO

FIG.4 Amplificación de la Región L1 de la línea celular CALO tratada con los nuevos compuestos.

Podemos observar que en la línea celular CALO las bandas correspondientes al compuesto 3 (F3) se observa una expresión de la región L1 disminuida, hasta menos de 30ng, es decir más de 6 veces que en el control (comparar con la Fig. 4).

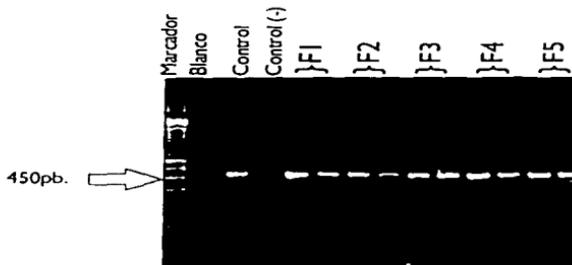
EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA REPLICACION VIRAL:
LINEA CELULAR VIPA

FIG.5 Amplificación de la Región LI de la línea celular VIPA tratada con los Nuevos Compuestos.

En esta figura observamos que los compuestos parecen no tener efecto significativo sobre la replicación de la región LI del virus, en esta línea celular pues todas las bandas están presentes en intensidad homogénea.

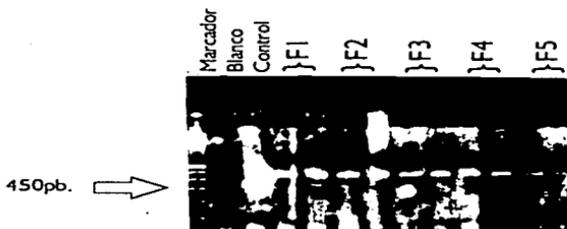
EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA REPLICACIÓN VIRAL:
LINEA CELULAR: INBL

FIG.6 Amplificación de la Región L1 de la línea celular INBL tratada con los nuevos compuestos.

En este caso podemos observar que las bandas que corresponden al tratamiento con el compuesto 5 (F5) se ven disminuidas hasta aproximadamente 30ng, es decir que la replicación parece esta inhibida hasta 6 veces.

Como se observa en las figuras 5,6 y 7 los fármacos no tienen influencia significativa en la replicación de la región LI viral y no hay datos relevantes, por un lado en la línea VIPA la amplificación se observa homogénea, mientras que en la línea CALO se detecta una ligera disminución en la replicación con el compuesto 3, pero que para la línea INBL se observa una disminución de la amplificación con el compuesto 5. En general no había datos contundentes, Por lo tanto el estudio siguiente se enfoca a la evaluación de la posible actividad de los fármacos en la transcripción de esta misma región viral.

EVALUACION DE LA POSIBLE ACTIVIDAD DE LOS NUEVOS COMPUESTOS SOBRE LA TRANSCRIPCION VIRAL DE LA REGION LI

Con el propósito de esclarecer la actividad de los nuevos compuestos sobre la transcripción se llevó a cabo una Hibridación por Northern Blot lo cual se realizó tratando a las células nuevamente con los compuestos, seguido de la extracción de RNA y posterior hibridación de RNAm de la región LI de células tratadas con una sonda marcada radiactivamente complementaria para la región LI con el objeto de detectar si los fármacos afectan la cantidad de RNAm de LI transcrito con respecto al control.

Los RNAs extraídos después del tratamiento, se muestran en la Fig. 7. Los resultados de la Hibridación Northern blot se muestran en la Fig. 8.



FIG.7 RNA's de las líneas celulares CALO, INBL, y VIPA, tratadas con los fármacos. Se obtienen los ribonucleos, 2B, 1B y 5, de arriba hacia abajo.

HIBRIDACION NORTHERN BLOT

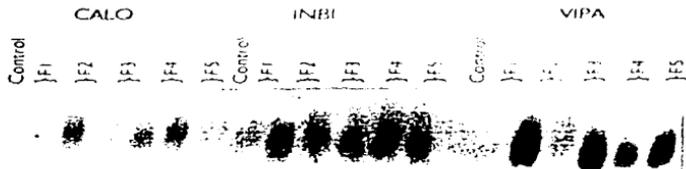


FIG.9 Radiografía de la Hibridación Northern Blot de las líneas celulares CALO, INBL y VIPA, después del tratamiento con los nuevos compuestos

En esta figura observamos que la el RNAm transcrito para la proteína L1 está en diferentes proporciones según el fármaco y según la línea celular.

IX. DISCUSION

Durante el cultivo de cada línea celular, observamos comportamientos diferentes para cada una de ellas incluso cuando todas las líneas en estudio eran líneas tumorales derivadas de cáncer cérvico-uterino. Por un lado las líneas tumorales INBL y CALO fueron relativamente fáciles de cultivar y resistieron cambios de CO₂, y periodos fuera de la incubadora. Mientras que la línea celular VIPA fue más difícil de conservar, esta línea era muy sensible a cambios de temperatura y humedad. Sin embargo para su crecimiento le fue suficiente el medio RPMI que es menos complejo que el medio de cultivo D-MEM, el cual se utilizó para el cultivo de las líneas celulares INBL y CALO. Después de muchos intentos se consiguió cultivar la línea VIPA y mantenerla en las condiciones del laboratorio.

Las curvas de crecimiento de estas líneas habían sido previamente realizadas en el laboratorio, y generalmente alcanzaban el crecimiento logarítmico entre 3 y 4 días. Esta fase de crecimiento se eligió para añadir los fármacos, con el fin de conocer si los daños causados a la línea celular son efecto de los compuestos añadidos y no del deterioro de vida de la célula por haber iniciado el tratamiento cuando su ciclo de vida ya estaba en decadencia.

También con este estudio pudimos comprobar la utilidad y versatilidad de la técnica de amplificación de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa. (PCR), la cual además de permitirnos identificar la presencia o expresión de regiones específicas del genoma, su versatilidad nos permite llevar a cabo estudios cuantitativos.

Por otro lado el desarrollo de la técnica de hibridación por Northern blot, da la oportunidad de trabajar de manera muy selectiva en la expresión de genes específicos. En este caso la sensibilidad es muy importante pues el RNAm buscado puede encontrarse en cantidades muy pequeñas, después del tratamiento con compuestos cuya respuesta no conocemos.

Los experimentos que se realizaron para determinar si los nuevos compuestos afectan la replicación viral, se llevaron a cabo por duplicado con el fin de demostrar la reproducibilidad del estudio.

EXPRESION DE LA REGION L1 EN CALO, VIPA e INBL

De la amplificación por PCR de la región L1 que codifica para la principal proteína de cápside del virus, de las líneas celulares: CALO, INBL, VIPA, HeLa y C33, fue para determinar si alguno de los virus de Papiloma humano estaba presente en la línea celular de cáncer cervicouterino VIPA. Cabe resaltar que la amplificación por PCR con oligonucleótidos específicos para esta región (MY09 y MY11, Manos Michele, 1990) son los que se utilizan con resultados satisfactorios para identificar la presencia de VPH en biopsias o incluso en análisis clínicos especiales (Richard Ralph M., 1995).

El peso molecular de esta proteína puede variar ligeramente para las diferentes cepas del virus de Papiloma, estas diferencias pueden ser visualizadas cuando los productos de amplificación de L1 se separan por electroforesis en gel de acrilamida (Manos Michele, 1990). En un gel de agarosa, donde la separación es menos fina, no se observan prácticamente diferencias. Sin embargo para los fines perseguidos es suficiente como experimento preliminar, saber que el gen este o no presente en la línea VIPA, como fue el caso.

Los resultados encontrados en la fig. 1 en el carril correspondiente a la amplificación del genoma de línea celular VIPA está presente la banda que representa a la región L1 del Virus de Papiloma Humano con un peso de 450 pb. como está descrito en la literatura (Manos Michele, 1990). Lo que indica que esta línea celular contiene a Virus de Papiloma Humano tal como se supuso en la hipótesis.

Para las líneas celulares de cáncer de cérvix INBL y CALO este experimento fue de confirmación pues se sabía de antemano por comunicación verbal que presentan VPH (Instituto de Investigaciones Biomedicas, Dr. Angel García Carrancá).

TIPIFICACION DEL VIRUS DE PAPILOMA

Se llevó a cabo la amplificación de secuencias específicas para la tipificación del VPH encontrado. Por un lado se amplificó con oligonucleótidos específicos de la región URR (de las siglas en inglés Upstream Regulatory Region) para el VPH tipo 16, en este caso no se encontró amplificación alguna, con lo cual descartamos la posibilidad de que los VPH encontrados, fueran del tipo 16. Por esta razón, se realizó otra amplificación pero en esta ocasión con oligonucleótidos específicos de la región URR del VPH 18. Se observa en la Fig. 2 que la línea celular VIPA presenta una banda que corresponde al peso esperado de 360pb de esta región. Con esto determinamos que el VPH, que presenta la línea tumoral cervical VIPA, es del tipo 18. Las líneas CALO e INBL presentaron también amplificación con lo cual confirmamos los resultados de estudios previamente realizados por Angel García C. y col. (comunicación verbal).

Se utilizaron en primera instancia los oligonucleótidos para estos dos tipos virales (16 y 18), debido a que son los dos tipos más frecuentes dentro del grupo de alto riesgo oncogénico causantes de cáncer de cérvix.

El resultado de la presencia del VPH en la línea celular en estudio, VIPA, estaba considerado dentro de la hipótesis ya que el cáncer de cérvix se encuentra asociado al VPH hasta en un 95% de los casos (Harald zur Hausen 1996), aunque existen reportes en la literatura acerca de tumores de cáncer de cérvix que no contienen virus de papiloma (Hans Ikenberg, 1995). También puede ser, como se mencionó en los resultados, que no necesariamente todas las células del tumor de cérvix estén infectadas con el virus de papiloma, puesto que no provienen de una clona.

Como se menciona anteriormente, los tipos más representativos asociados etiológicamente con la enfermedad son el 16 y el 18. Siendo el VPH tipo 16, dos veces más frecuente que el 18. Cabe resaltar que el VPH 18 está presente en el 10-25% de todos los casos de cáncer de cérvix. Sin embargo, se sospecha que este porcentaje pueda ser menor debido a que se han detectado nuevos tipos de VPH muy relacionados genéticamente con el VPH 18, lo que ha llevado a creer que tal vez parte de los virus identificados como VPH tipo 18, encontrados en biopsias, son falsos

positivos y son otros tipos de VPH los que en realidad están implicados (Harald zur Hausen 1996)

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS NUEVOS COMPUESTOS

La segunda parte de este trabajo fue el estudio de cinco compuestos de síntesis reciente. Estos compuestos ya habrían sido probados como agentes antiproliferativos en líneas celulares tumorales mediante la técnica del MTT (E. Díaz, A. Quintero, J. Solano 1997), sin mostrar resultados significativos.

Evaluación de la posible actividad sobre la replicación viral

Estos compuestos fueron en realidad diseñados como agentes antivirales, por lo que se estudió su potencial actividad sobre mecanismos de reproducción viral, se llevó a cabo la determinación del posible efecto sobre la replicación, se supuso que estos compuestos podían disminuir o inhibir la replicación lo cual sería detectado por la disminución de la intensidad o desaparición de las bandas de amplificación.

Evaluación de la Posible Actividad sobre la Transcripción Viral

Como se observa en las figuras 5,6 y 7 los nuevos compuestos no tienen influencia significativa en la replicación de la región LT viral y los resultados no proporcionan mucha información. Fue por eso que el experimento subsecuente se enfocó a la evaluación de la posible actividad de los compuestos sobre la transcripción (tomando en cuenta que compuestos sintetizados con potencial actividad antiviral, pueden actuar por diferentes mecanismos, como precursores de ácidos nucleicos, inhibición del ensamblaje de los mismos, interacción directa con material genético, o bien en procesos para ejercer sus funciones de replicación, transcripción y síntesis proteica. Compuestos con potencial actividad antiviral pueden interactuar con material genético de diversas formas, pueden formar enlaces covalentes, intercalarse entre las bases nitrogenadas, formar uniones en el surco de DNA o formar complejos estables y no funcionales con RNA o DNA.

Fuera de lo esperado, observando la Fig. 9, todo parece indicar a primera vista que los compuestos lejos de inhibir la transcripción de esta región viral, parecen estimularla, pues se observa claramente que existe mayor cantidad de RNAm transcrito en los todos los casos tratados de las células tratadas con los diferentes compuestos, en relación con las células sin tratamiento. En las regiones correspondientes a las células control, apenas es apreciable la cantidad de RNAm, es decir, en condiciones normales la cantidad necesaria de esta proteína es poca comparada a la que se transcribe cuando se exponen a los compuestos.

Sin embargo, en contacto con las nuevas moléculas, todas las líneas celulares presentan el transcrito en mayor cantidad, sobre todo en el caso de los compuestos 1, 3 y 5; además es notorio que la tendencia es la misma en las tres líneas, aunque para el caso de VIPA la expresión de este transcrito es mucho más intensa. Esto último resalta que existe variabilidad biológica entre diferentes líneas celulares de un mismo tejido, incluso infectadas con el mismo tipo de VPH.

La actividad de estas moléculas sobre la transcripción del VPH en estas líneas celulares, sugiere que estructuralmente estos compuestos ejercen una actividad biológica, sobre el mecanismo de transcripción. A pesar de que este efecto no fue el deseado, es importante resaltar, que estas moléculas están interaccionando con la maquinaria que utiliza el virus para transcribirse, por lo que es posible que a través de pequeñas modificaciones estructurales a estos compuestos se pueda dirigir su actividad contra el mecanismo viral, de la manera buscada.

Las explicaciones a este comportamiento no esperado, pueden variar, podemos decir que estos compuestos definidos como posibles antivirales, podrían estar actuando de varias formas, según su estructura.

Solamente como una posible sugerencia o hipótesis para explicar el comportamiento observado podemos proponer ciertas situaciones que podrían estar ocurriendo a nivel celular, con los compuestos en estudio:

En este caso, intentando elucidar una posible explicación, podríamos suponer que estos compuestos están interaccionando con el RNA durante el proceso de

transcripción, ya sea mediante la formación de enlaces covalentes, formación de puentes de hidrógeno o por intercalación entre bases nitrogenadas (se supone lo anterior con el fundamento de que la mayoría de los fármacos antivirales siguen alguno de estos mecanismos), observando las moléculas podemos asumir que lo más factible es que estén formando puentes de hidrógeno con el material genético, originando finalmente un RNAm no funcional, pudiera ser por la formación de un complejo [Compuesto- RNA]estable, lo que provoca que el RNA no lleve a cabo sus funciones, y la célula responde sintetizando más RNAm, que es la cantidad aumentada observada en la radiografía (fig. 8)

Otra posibilidad es que la célula esté transcribiendo, RNA normalmente, pero el RNAm que interacciona con los compuestos forme un complejo difícil de metabolizar por la célula, el cual aumenta su tiempo de vida media en el interior celular y se acumula, esto podría ser lo que se observa en la Fig.8, una mayor cantidad de RNAm acumulado por disminución de su metabolismo.

Hay que resaltar que lo mencionado anteriormente es solo un intento para sugerir lo que posiblemente esté ocurriendo con la transcripción del RNAm.

De estos experimentos encontramos que los compuestos en estudio no tienen actividad antiviral.

Para elucidar los mecanismos moleculares que están ocurriendo en los resultados aquí expuestos podríamos continuar experimentos como: a) Marcar los compuestos radiactivamente y medir su incorporación a diferentes compartimentos celulares, como núcleo o directamente a DNA, RNA o enzimas encargadas de la síntesis de estas moléculas b) Realizar un Southern blot con el fin de determinar directamente la presencia y cantidad del gen de LI después de la exposición a los compuestos. c) También sería de interés detectar la presencia y funcionalidad de la proteína LI, lo primero puede llevarse a cabo con anticuerpos monoclonales y la funcionalidad puede determinarse sometiendo a la proteína LI de células tratadas a mostrar su capacidad de formación de partículas semejantes a virus (VPL's)

X. CONCLUSIONES

Del presente estudio podemos concluir que:

- I. La línea celular de cáncer cérvico-uterino: VIPA, presenta el Virus de Papiloma Humano (VPH), el cual resultó ser del tipo 18. Este tipo de VPH abarca en todo el mundo del 10 al 25% de todos los casos de cáncer de cérvix infectados con virus de papiloma.
- II. Corroboramos que la técnica de amplificación por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un método sensible, específico y rápido por lo cual es de potencial uso en la clínica como complemento de la prueba del Papanicolaou, con el fin de detectar posibles infecciones con VPH en biopsias sospechosas, y así poder disminuir con anticipación el grado de riesgo de una paciente para desarrollar cáncer cérvico uterino si se detecta el VPH esto resulta de importancia, debido a que en México como en otros países en vías de desarrollo el cáncer de cérvix es un grave problema de salud.
- III. Con respecto al estudio de los nuevos compuestos demostramos que no inhiben la replicación, ni la transcripción viral, por el contrario parecen estimular la transcripción del RNA m que codifica para la proteína L1, con lo que concluimos que ninguno de los compuestos aquí estudiados, presentan actividad antiviral.

ABREVIATURAS

- ZAP 2-Amino purina (Antimetabolito)
- ATCC American Type Culture Collection (Catálogo)
- BrdUrd 5-Bromodesoxiuridina
- BVP Virus de Papiloma Bovino
- CIN Neoplasia Intraepitelial Cervical
- c.b.p. Cantidad bastante para
- DNA Acido desoxirribonucleico
- DHFR Dihidrofolatoreductasa (enzima del metabolismo de ácidos nucleicos)
- dUMP Desoxiuridina monofosfato
- FdUMP 5-Florodesoxiuridina
- HEPES Acido N 2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etansulfónico
- HGPRT Hipoxantina guanina fosforribosil transferasa
- IMP Inositol Monofosfato (precursor de ácidos nucleicos)
- MTT Bromuro de 3-4,5dimetiltiazol[2il-2,5-difeniltetrazolio
- ORF Marco Abierto de Lectura del inglés Open Reading Frame
- pb. Pares de bases
- PCR Reacción en Cadena de la Polimerasa
- RNAm Acido ribonucleico mensajero
- r.p.m. revoluciones por minuto
- SIL Lesión Intraepitelial Escamosa
- SSCP Polimorfismo Conformacional de una Sola Cadena de DNA
- TE Buffer de Tris-EDTA
- TBE Buffer de Tris-Cl, Boratos y EDTA
- μ l Microlitros
- VP Virus de Papiloma
- %V/V Porcentaje volumen:volumen

GLOSARIO

- **ADENOCARCINOMA:** Tipo de cáncer que involucra a las glándulas del tejido que está afectando.
- **APOPTOSIS:** Se define como muerte celular programada. La célula utiliza este recurso cuando su genoma tiene muchas alteraciones y ya no es capaz de repararlo.
- **CROMATINA:** Complejos de DNA y proteínas.
- **CARCINOMAS:** Formas más comunes de cáncer, originados en células epiteliales que delimitan cavidades corpóreas y forman capas externas de la piel.
- **GLIOBLASTOMA:** Tipo de cáncer que afecta el cerebro.
- **GLIOMA:** Tipo de cáncer que afecta el cerebro.
- **NORTHERN BLOT:** Hibridación de RNA con la secuencia complementaria de DNA.
- **ONCOGEN:** Proto-oncogen mutado que sobreexpresa proteínas para proliferación celular.
- **PROTO-ONCOGEN:** Gen que codifica para proteínas encargadas de la proliferación celular.
- **TROPISMO:** Característica de un organismo para infectar y sobrevivir solamente un tejido en específico.
- **TELOMERO:** Parte lineal en los cromosomas que permiten la replicación.
- **VIRUS DE PAPILOMA BOVINO:** Virus de Papiloma que solo infecta a los bovinos. Comparte similitudes estructurales con el VPPH, pero no comparten muchos eventos moleculares.
- **VIRUS LIKE PARTICLES (PARTICULAS SEMEJANTES A VIRUS):** Se les llama así a las partículas que son producto de síntesis humana y se asemejan a la estructura externa de un Virus de papiloma, pero carecen de DNA.
- **SUPRESORES TUMORALES:** Son proteínas que generalmente tienen una función como reguladoras del ciclo celular y están encargadas de emitir señales o actuar directamente para impedir o disminuir la proliferación celular.
- **BASES NITROGENADAS:** Se les llama así por su carácter básico debido al número de átomos de Nitrógeno que presentan, aunque cabe resaltar que ciertas partes de la molécula pueden ser ligeramente ácidas por la presencia de grupos carbonilo. Son constituyentes primordiales de los nucleótidos formadores de DNA y RNA.

BIBLIOGRAFIA

1. Alan Storey, Antonella Piccini, Paola Massimi. Mutations in the human papillomavirus type 16 E2 protein identify a region of the protein involved in binding to E1 protein. *Journal of General Virology* 76, 819-826 1995.
2. Allison P. Cullen, Richard Reid, Michael Campion. Analysis of the Physical State of different Human Papillomavirus DNAs in Intraepithelial and Invasive Cervical Neoplasm. *Journal of Virology* 65, 606-612, 1991.
3. Anders Isaksson, Anna Maria Musti, Dirk Bohmann. Ubiquitin in signal transduction and cell transformation. *Biochimica et Biophysica Acta* F21-F29, 1996
4. Annick Clement, M.D., Judith Campisi, Ph.D. Chapter 2 Cell Cycle Regulation and Growth Control. *Comprehensive Textbook of Oncology Vol. 1 Williams and Wilkins, second edition 1993*
5. Anthony E. Howes, M.D. Chapter 99 Cancer of the Uterine Cervix. *Comprehensive Textbook of Oncology Vol. 1 Williams and Wilkins, second edition 1993.*
6. Bernd- Uwe Sevin, Mehrdad Hadji. Prognostic Factors of Early Stage Cervical Cancer Treated by Radical Hysterectomy. *Cancer Supplement, 76 , 1978-1986 1995.*
7. Beth G. Etscheid, Scott A. Foster. The E6 protein of Human Papillomavirus Type 16 Functions as a Transcriptional Repressor in a Mechanism Independent of the Tumor Suppressor Protein, p53. *Virology* 205, 583-585, 1994.
8. Biomédicas, Noticiero Biomédicas, Primera Reunión Oficial del Programa Aplicativo de Investigación en Salud, Año 2, 5 1997.
9. Biomédicas, Noticiero Biomédicas, Modulación de la Dieta y Carcinogénesis Año 2, 6 1997
10. Bruce E. Clurman, James M. Roberts. Cell Cycle and Cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 87, 1499-1501, 1995.
11. C. Avendaño Introducción a la Química Farmacéutica , Edt. Interamericana, Mc Graw Hill, España 1994
12. Caroline McNeil Consensus Panel on Cervical Cancer Highlights. The HPV Connection. *J Natl. Cancer Inst.*, 88,575, 1996.

13. Catherine Ley, Heidi M. Bauer. Determinants of Genital Human Papillomavirus Infection in Young Women. *J Natl. Cancer Inst.* 83, 997-1003, 1991.
14. Charles E. Riggs, John P. Bennet. Chapter 55 Principles of Cancer Chemotherapy. *Comprehensive Textbook of Oncology Vol. 1* Williams and Wilkins, second edition 1993.
15. Charles E. Riggs, John P. Bennet. Chapter 56 Clinical Pharmacology of Individual Antineoplastic Agents. *Comprehensive Textbook of Oncology Vol. 1* Williams and Wilkins, second edition 1993.
16. Chuan- Yuan Li, Hatsumi Nagasawa, William K Dahlberg. Diminished capacity for p53 in mediating a radiation-induced G1 arrest in established human tumor cell lines. *Oncogene* 11, 1885-1892, 1995.
17. David O. White, Frank Fenner. *Papovaviridae* Chapter 18 *Medical Virology* 4^o Ed. Cal. USA 1994.
18. Donald Hart Henson, Gladys Block, Mark Levine. Ascorbic Acid: Biologic Functions and Relation to Cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 83, 8, 547- 550, 1991.
19. Eduardo Diaz, Héctor Barrios, Angel Guzmán. Stereoselective Addition of 6-Amino-1,3-dimethyl- 2,4 pyrimidinedione to the Exocyclic Methylene of Three Sesquiterpene Lactones. *J Heterocyclic Chem.* 34, 1, 1-5, 1997.
20. Elizabeth Schwartz, Ulrich Karl Freese, Lutz Gissmann. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cell lines. *Nature* 314, 7, 111-115, 1985.
21. Erkki Ruoslahti. How Cancer Spreads. *Scientific American* September 1996.
22. Fernando Alcántar Magaña TESIS: Estudio de mecanismo de la Resistencia a Fármacos de la Célula Tumoral, Fac. Química, 1990.
23. Franco Berrino, Paola Muti, Andrea Micheli. Serum Sex Hormone Levels After Menopause and Subsequent Cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 88, 5, 291-295, 1996.
24. Goodman y Gilman *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* 8^o edición. Argentina 1993.
25. Hans Ikenberg, Klaus Matthay, Beatrice Schmitt. P53 Mutation and MDM2 Amplification are Rare Even in Human Papillomavirus Negative Cervical Carcinomas. *Cancer* 76, 1, 57-65, 1995.

26. Hans Ikenberg, Willi Sauebrbrei, Ursula Schottmüller. Human Papillomavirus DNA in Cervical Carcinoma. Correlation with clinical data and Influence on Prognosis. *Int. J. Cancer* 59, 322-326, 1994.
27. Harald zur Hausen. Papillomavirus infections - a major cause in human cancers. *BBA* 12,88, F55-F78, 1996.
28. Harold Freeman. Editorial Race, Poverty, and Cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 83, 8 526-528 1991.
29. Harstrick, A. U. Vanhoefel, N. Schleucher. Activity of N-benzyl-adriamycin-14valerate (AD 198), a new anthracycline derivative, in multidrug resistant human ovarian and breast carcinoma cell lines. *Anti-Cancer Drugs* 6, 681-685, 1995.
30. <http://www.Papilloma-virus-Quel-treatment-medical3-European-Research-Org-On-Genital-Infection-and-Neoplasia-June-1997>
31. Jaime Berumen, Leonora Casas, Enka Segura. Genome Amplification of Human Papillomavirus types 16 and 18 in Cervical Carcinomas is Related to the Retention of E1/E2 Genes. *Int. J. Cancer* 56, 640-645, 1994.
32. Janet Glover. Scientists Study Co-factors of HPV-Associated Cervical Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1096-1097, 1990.
33. John T. Schiller, Richard B.S. Rodon. Papillomavirus Like Particles. *Papillomavirus Report*, 6, 5, 121, 128, 1995.
34. Joakim Dillner. Antibody response to Defined HPV Epitopes in Cervical Neoplasia. *Papillomavirus Report* 5, 2, 35-41, 1994.
35. Joel M. Palefsky. Serologic Detection of Human Papillomavirus - Related Anogenital Disease: New Opportunities and Challenges. *J Natl. Cancer Inst.* 87, 6, 401-402, 1995.
36. John F. R.Kerr, Clay M. Winterford. Apoptosis. *Cancer* 73, 8, 2013-2023, 1994.
37. Jonathan Ham, Nathalie Dostanti. The Papillomavirus E2 protein: a factor with many talents. *TIBS*, 16, 440-444, 1991.
38. Karin Butz, Lili Shahabuddin. Functional p53 protein in human papillomavirus positive cancer cells. *Oncogene*, 3, 927-935, 1994.
39. Keng-Ling Chua, Anders Hjerpe. Persistence of Human Papillomavirus (HPV) Infections Preceding Cervical Carcinoma. *Cancer* 77, 1, 121-127, 1996.

40. Klaus Dartmann, Elizabeth Schwarz. The Nucleotide Sequence and Genome Organization of Human Papillomavirus Type 11. *Virology*, 151, 124-130, 1986.
41. Kumiko Jiko, Hitoshi Tsuda. Pathogenic Significance of p53 and c-Ki-ras gene mutations and Human Papillomavirus DNA integration in Adenocarcinoma of The Uterine Cervix. *Int. J. Cancer*, 59, 601-606, 1994.
42. L. Austin Doyle. Chapter 1 Overview of Normal and Cancer Cell Biology. *Comprehensive Textbook of Oncology*. Williams and Wilkins Baltimore MD. 1991.
43. Leland H. Hartwell, Michael Kastan. Cell Cycle Control and Cancer. *Science* 266, 16, 1821-1827, 1994.
44. Leon Shigel *Comprehensive Pharmacy Review 2nd edition*, Harwal Publishing, 1994 USA.
45. M Tom Parker, Leslie H. Collier. Principles of Bacteriology, Virology, and Immunity. Topley and Wilson's Vol 4 Morgan Timbry. USA 1990.
46. Margot Kaelbling, Robert Burk. Loss of heterozygosity on chromosome 17p and mutant p53 in HPV - negative cervical carcinomas. *The Lancet* 340, 140-143, 1992.
47. Mario Clerici, Marina Menola, Erica Ferrara. Cytokine Production Patterns in Cervical Intraepithelial Neoplasia: Association with Human Papillomavirus Infection. *J Natl. Cancer Inst.* 89, 245-250, 1997.
48. Mark H. Schiffmann, Louise A Briton. The Epidemiology of Cervical Carcinogenesis. *Cancer Supplement* 76, 1888-1901, 1995.
49. Mark Messina, Stephen Barnes. The Role of Soy Products in reducing Risk of Cancer. *J Natl. Cancer Inst.* 83, 8, 541-545, 1991.
50. Marta Molinari, Jo Milner. P53 in complex with DNA is resistant to ubiquitin-dependent proteolysis in the presence of HPV-16 E6. *Oncogene* 10, 1849-1854, 1995.
51. Martin Scheffner, Karl Münger, Janet Byrne. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 5523-5527, 1991.
52. Mary A. Bedell, John Hudson, Todd Galub. Amplification of Human Papillomavirus Genomes In Vitro is Dependent on Epithelial Differentiation. *Journal of Virology*, 65, 2254-2260, 1991.

53. Masami Fujita, Masaki Inoue. Alterations of the p53 gene in Human Primary Cervical Carcinoma with and without Human Papillomavirus Infection. *Cancer Research* 52, 5323-5328, 1992.
54. Mathews Van Holde. *Biochemistry*, The Benjamin Cummings Pub Co. USA, 1995.
55. Michele Manos, Yi Ting. *Detection and Typing of Genital Human Papillomaviruses. PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*. Academic Press 1990.
56. Moran Scrimgeour Horton et al. *Biochemistry*, Prentice Hall N York 1994.
57. Michael Krawczak, Brigitte Smith Sorensen. Somatic Spectrum of Cancer Associated Single Basepair Substitutions in the TP53 Gene is Determined Mainly by Endogenous Mechanisms of Mutation and by Selection. *Human Mutation* 5, 48-57, 1995.
58. Michelle Follen Mitchel, Walter Hittelman. Chemoprevention Trials and Surrogate End Point Biomarkers in the Cervix. *Cancer Supplement* 76, 10, 1956-1977, 1995.
59. Miranda Thomas, Paola Massimi. HPV-18 E6 inhibits p53 binding activity regardless of the oligomeric state of p53 recognition sequence. *Oncogene* 13, 471-180, 1996.
60. Mitra A. B. V. Murty. Allelotype Analysis of Cervical Carcinoma. *Cancer Research* 54, 4481-4487, 1994.
61. Nancy Breen. Cervical Cancer Screening by Age, 1987-1992. *J Natl. Cancer Inst.* 88, 6, 323, 1996.
62. Patrizia Tenti, Solange Romagnoli. Analysis and Clinical Implications of K-ras gene mutations and Infection with Human Papillomavirus types 16 and 18 in primary Adenocarcinomas of the Uterine Cervix. *Int J. Cancer* 64, 9-13, 1995.
63. Peter C. Nowell. How Many Human Cancer Genes? *J Natl. Cancer Inst.* 83, 15, 1061-1065, 1991.
64. Pirkko Heino, Carina Eklund. Association of Serum Immunoglobulin G Antibodies Against Human Papillomavirus Type 16 capsids with Anal Epidermoid Carcinoma. *J Natl. Cancer Inst.* 87, 6, 437-440, 1995.
65. R. Kauppinen. Single Strand conformation polymorphism (SSCP) analysis applied to the diagnosis of acute intermittent porphyria. *Molecular and Cellular Probes* 6, 527-530, 1992.

66. Ralph M. Richart. Screening, *The Next Century. Cancer Supplement* 76, 10, 1919-1927, 1995.
67. Richard B. Roden, Reinhard Kirnbauer. Interaction of Papillomaviruses with the Cell Surface. *Journal of Virology* 68, 11, 7260-7266, 1994.
68. Probert A. Weinberg. How Cancer Arises. *Scientific American* September 1996.
69. Robert N. Resnick, Marion Cornelissen. Detection and Typing of Human Papillomaviruses in Archival Cervical Cancer Specimens by DNA Amplification with Consensus Primers. *J Natl. Cancer Inst.* 82, 18, 1477-1483, 1990.
70. Rona E. Parkinson and Jonathan D. Geiger Effects of Iodotubercidino on Adenosine Kinase Activity and Nucleoside Transport in DDT1 MF-2 Smooth Muscle Cells. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 227, 1996.
71. Tjong-Won Park, Hisaya Fujiwara. Molecular Biology of Cervical Cancer and its Precursors. *Cancer Supplement* 76, 10, 1919-1927, 1995.
72. Tjong-Won Park, Ralph M. Richart. Association between Human Papillomavirus type and Clonal status of Cervical Squamous Intraepithelial Lesions. *J Natl. Cancer Inst.* 88, 6, 1996.
73. T.C. Wu, Robert Kurman. Analysis of Cytokine Profile in Patients with Human Papillomavirus Associated Neoplasms. *J Natl. Cancer Inst.* 89, 3, 185 1997.
74. Voet D y Voet J. *Biochemistry* Wie Wiley 1990 USA.
75. Webster K. Cavenee, Raymond White. *Bases Genéticas del Cáncer. Investigación y Ciencia*, mayo 1995.

FE DE ERRATAS

En la página 72, en el párrafo IV, renglón 2, debe decir solamente: Estos nuevos compuestos fueron diseñados como potenciales agentes antivirales.

En la página 81 debe decir 1 nuevos Compuestos en lugar de Farmacos.

En la página 63 en lugar de análogos de bases en la línea punteada debe decir antineoplásicos y antivirales.

A partir del capítulo de NUEVAS MOLECULAS la palabra farmaco se refiere a los 1 nuevos Compuestos.