



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN”
DEPARTAMENTO DE HEMATOLOGÍA Y ONCOLOGÍA CURSO DE
POSTGRADO DE ONCOLOGÍA MÉDICA

“FRECUENCIA DE VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN
ADENOCARCINOMA DE COLON Y RECTO EN PACIENTES DEL
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y DE NUTRICIÓN
“SALVADOR ZUBIRÁN” (INCMNSZ)”

TÉSIS DE POSTGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE LA ESPECIALIDAD EN:
ONCOLOGÍA MÉDICA

PRESENTA:

DR. JULIO ROBERTO RAMÍREZ VELÁSQUEZ

TUTOR:

DR. EUCARIO LEÓN RODRÍGUEZ

COTUTOR:

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA



MÉXICO DF AGOSTO 2008



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.

Dr. Eucario León Rodríguez
Tutor de Tesis
Coordinador del Departamento de Hematología y Oncología Médica Instituto
Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Cotutor de Tesis
Encargado del Departamento de Bioquímica
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Dr. Luís Federico Uscanga Dominguez
Jefe de Enseñanza
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

<<Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por la
Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México>>

ÍNDICE

Índice:	Página.
Agradecimientos:	04
Resumen:	05
Justificación:	06
Objetivos e Hipótesis:	07
Introducción:	08
Diseño del Estudio:	09
Pacientes Incluidos:	19
Resultados:	25
Discusión y Análisis de Resultados:	27
Conclusiones:	40
Perspectivas:	43
Bibliografías:	44
	45

AGRADECIMIENTOS

A mi Dios: por permitirme ser su hijo, dirigirme a lo largo de éstos años y llevarme hasta donde estoy. Nada sería posible sin su amor y dirección. La hoja del árbol no se mueve sin Él saberlo.

A mis padres: Roberto y Esther, por colocar en mi el deseo de luchar y servir a los demás. Por su ejemplo en la lucha cotidiana de la vida. Los amo y reconozco sus luchas y esfuerzo para colocarme hasta acá.

A mis hermanos: Shirley, me has inspirado a luchar a pesar de las adversidades. Nancy, como mi ángel guardián desde la ropa hasta algunas confidencias, te quiero. Kimmy, luchando juntos por ser mejores para ser más útiles. Roberto, diste luz y alegría a la casa nunca me divierto más que cuando jugamos juntos.

A mi familia Mexicana: Agradezco a Dios por ponerlos a todos allí, durante mi estancia acá no hubo nada más gratificante que estar todos los sábados en compañía de mi Dios y mis hermanos.

A la Dra. Luciana Mendoza: Gracias por su apoyo. Muchas veces habría caído en la desesperación si no hubiera sido por las llamadas tan oportunas, le aprecio.

A mis maestros: Dr. Eucario León, Dr. Alejandro Zentella, Dr. Dan Gréen, Dr. Roberto de la Peña, Dra. Xochitl Gómez, Dra. María de Jesús Ibarra, que con sus enseñanzas y dedicación me mostraron el camino para llegar a la meta, de cada uno aprendí desde Oncología hasta lecciones de vida.

A mis compañeros de residencia: Noé Castro, Gabriela Alvarado, Luís García, Cynthia Villareal, Juan Pablo, Florecita, y el resto de Chapines, gracias por su apoyo muchá y por su amistad.

A mis pacientes mexicanos: Sería injusto mencionar únicamente el nombre de algunos, pero de todo corazón agradezco su confianza y cariño. Agradezco el cariño manifestado hacia mí y hacia mi familia.

A quienes colaboraron en la realización de ésta tesis: Dr. Alejandro Zentella, Dr. Eucario León, Dra. Maria Teresa Tusié Luna, Dra. Marcela Lizano, Dra. María de Jesús Ibarra, Dra. Gloria I. Vizcaíno Tapia, Dr. Josué Barahona, Biol. Maria Luisa Ordóñez Sánchez, Dra. Florencia Vargas Vorackova, Dr. Oscar Xavier Hernández Rodríguez, Adela Carrillo García.

RESUMEN

En el presente estudio se determinó la frecuencia de VPH en adenocarcinoma colo-rectal y en mucosa normal (34.2% vs 5.3% $P=0.021$). También se implementaron las metodologías que permiten obtener ADN de adenocarcinomas colo-rectales crío preservados o de biopsias frescas tanto de colonoscopías como de cirugías con intento curativo o paliativo. El ADN genómico obtenido permitió amplificar un fragmento del gen de la apolipoproteína-E empleado como control en el 81.8% de las muestras estudiadas. De los tres pares de oligonucleótidos empleados para amplificar parte del gen L1 de diferentes tipos de VPH los pares denominado MY y GP generaron productos de PCR del tamaño esperado (452 y 116 pb respectivamente) que correspondieron a la secuencia del gen L1 del tipo VPH18.

JUSTIFICACIÓN

Conocer la etiología viral del cáncer permite incidir en este factor para así prevenirlo. Lo anterior ha sido ampliamente demostrado en el carcinoma cérvico-uterino con el VPH lo que desembocó en el desarrollo de una vacuna cuadrivalente capaz de prevenir la infección de los tipos 6, 11, 16 y 18 con efectividad cercana al 100% que se espera elimine la probabilidad de cáncer (17).

Tener conocimiento sobre la asociación del VPH en la carcinogénesis del cáncer colo-rectal sería de utilidad para la detección de poblaciones en riesgo y eventualmente poder influir sobre la incidencia y desarrollo de la carcinogénesis de manera temprana y así prevenirlo. Kirgan en su estudio de VPH en cáncer de colon, utilizando la técnica de hibridación in situ a muestras positivas con inmunohistoquímica, detectó el antígeno viral en 23% del tejido normal, en 60% de los tumores benignos y en 97% de los carcinomas (24). Cuatro estudios utilizando la técnica de PCR en tejido fresco y en tejido preservado en parafina reportaron fragmentos del genoma viral hasta en un 83% de los carcinomas colo-rectales. En la población Mexicana no se ha estudiado la asociación entre VPH y cáncer colo-rectal, por lo tanto, nosotros nos propusimos mediante un estudio retro-prospectivo investigar si existe esta relación, y establecer la frecuencia con la que se presenta la infección con VPH en pacientes con cáncer colo-rectal tratados en el INCMNSZ.

El presente trabajo también permitió montar y validar la técnica de detección de ADN de VPH en muestras crío preservadas y muestras frescas de tumores colo-rectales así como en tejido no tumoral.

OBJETIVOS PRIMARIOS

1. Determinar la frecuencia y tipos de VPH en tejido crío preservado y fresco de tumores malignos de colon y recto de pacientes tratados en el INCMNSZ desde 1998 hasta julio de 2008.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

1. Exponer al residente al laboratorio de investigación básica y familiarizarlo con las técnicas moleculares utilizadas cotidianamente como herramientas diagnósticas y preventivas.
2. Acercar al residente al razonamiento y a los diseños experimentales de la investigación básica y sus aplicaciones al diagnóstico y la prevención.

HIPOTESIS

1. Los diferentes tipos de VPH se detectan en más del 50% de los tumores malignos del colon y recto en la población de pacientes atendidos en el INCMNSZ.

HIPOTESIS ALTERNA

1. Los diferentes tipos de VPH **no** se detectan en más del 50% de los tumores malignos de colon y recto en la población de pacientes atendidos en el INCMNSZ.

INTRODUCCIÓN

Cáncer de Colon: El cáncer de colo-rectal es uno de los tumores malignos diagnosticados con mayor frecuencia en el mundo con más de un millón de nuevos casos cada año, siendo un 10% de todos los tumores malignos. Se estima una mortalidad mundial anual de 450,000 casos (1). Para el año 2006, en los Estados Unidos ocupó la tercera causa de morbilidad tanto para hombres como para mujeres con 72,800 y 75,810 casos respectivamente. Ocupó la segunda y tercera causa de mortalidad en ambos grupos con 27,870 y 27,300 defunciones en el mismo año respectivamente (2). En México en el año 2005 los tumores malignos fueron la tercera causa de muerte con 63,128 muertes, lo que representó el 12.7% del total de las defunciones registradas. En los varones, los tumores malignos representaron la segunda causa de muerte con 30,899 defunciones, mientras que en las mujeres el cáncer se ubicó en el tercer lugar con 32,224 decesos. Del total de muertes por cáncer, el cáncer colo-rectal representó el 4.4% en ambos sexos con 1,360 y 1,418 muertes respectivamente (3). En cuanto a la prevalencia mundial, este tumor ocupa el segundo sitio con un 11.5% únicamente superado por el cáncer de mama, que ocupa el 17.9%. Según el Servicio de Vigilancia y Epidemiología de los Estados Unidos de Norteamérica, para el año 2004, 39% de los tumores colo-rectales se presentaron en etapas confinadas al sitio primario, el 36% se había diseminado a los ganglios regionales mas allá del sitio primario y 19% se diagnosticaron con metástasis a sitios distantes, existió un 5% en los cuales no se conoció el estadio. El porcentaje estimado de supervivencia a 5 años de cáncer colo-rectal en países desarrollados alcanza un 56 y 54% para hombres y mujeres respectivamente, en contraste, en los países en vía de desarrollo (México entre ellos) en los que dicho porcentaje cae dramáticamente hasta un 39% en ambos géneros (1).

A pesar del conocimiento actual y los nuevos agentes de quimioterapia en su papel adyuvante, cerca del 50% de los pacientes que se tratan con intento curativo recaerán y morirán por cáncer colo-rectal (11). La mortalidad asociada a ésta enfermedad podría disminuir significativamente si existieran medidas eficientes de prevención y detección temprana.

La predisposición genética contribuye de forma importante al riesgo de cáncer colo-rectal esporádico, dependiendo del involucro de familiares de primer y segundo grado o ambos así como la edad en la que se diagnosticó el cáncer colo-rectal. El involucro a por lo menos un familiar de primer grado con cáncer colo-rectal dobla el riesgo de

padecerlo (25). Los estudios que evalúan dieta alta en grasas saturadas y baja en fibras son controversiales, pero parecen favorecer el evitar grasas saturadas y consumir adecuada cantidad de fibra. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual el estilo de vida sedentario asociado a obesidad se ha relacionado con mayor incidencia de cáncer colo-rectal, se considera un factor de riesgo mayormente en cáncer de colon y no tanto del de recto. El consumo de cigarrillos con un índice tabáquico mayor de 20 se ha relacionado a un riesgo mayor de adenomas y el índice tabáquico mayor de 35 con un incremento del riesgo de cáncer (25). Un elevado nivel socioeconómico también ha sido relacionado quizá en asociación a los hábitos alimentarios y estilos de vida sedentarios predominantes en naciones desarrolladas. Si bien sabemos que todos los factores mencionados anteriormente pueden incrementar el riesgo de cáncer colo-rectal desconocemos aún los mecanismos moleculares que podrían explicar la carcinogénesis que median estos factores, los mismos aún son campo de intensa investigación.

Se acepta que deben existir múltiples mutaciones para que se lleve a cabo la carcinogénesis en cáncer colo-rectal (37), sin embargo, ¿Por qué no siempre *APC* es la primera mutación en cáncer colo-rectal? ¿En qué secuencia suceden las mutaciones de *K-Ras*, *p53* después de *APC*, así como otros genes que se han identificado? Y ¿cómo contribuye cada uno de ellos para el comportamiento irrestricto de las células del cáncer? Ciertamente no existe una respuesta simple a éstas preguntas, debido a que el cáncer puede generarse por más de una ruta. En algunos casos la primera mutación que dirige al cáncer puede ser la de un gen de reparación del ADN, en otros casos puede ser en un gen de regulación del crecimiento.

No obstante, ciertos patrones de eventos son particularmente comunes. Así, mutaciones que inactivan el gen *APC* parecen ser el primer evento, o al menos uno de los primeros. Éste paso puede ser detectado ya en pólipos pequeños benignos en la misma frecuencia que en los tumores malignos. La pérdida de *APC* parece incrementar el ritmo de la proliferación celular en el epitelio del colon sin afectar la forma en que las células se diferencian o los detalles de los patrones histológicos que forman. Este fenotipo se explica por la importancia de *APC* en la ruta de señalización Wnt, que controla la proliferación, diferenciación y muerte apoptótica de las células del epitelio colónico (29).

Las proteínas Wnt son moléculas de señalización que actúan como mediadores locales que participan en el control del desarrollo en animales. Fueron descubiertos independientemente en moscas y ratones: en *Drosophila*, el gen *wingless* (del inglés sin

alas) (*wg*) salió a la luz debido a su papel en el desarrollo de las alas, mientras que en los ratones, el gen *Int-1* se encontró en el desarrollo de tumores de mama cuando se activaba por integración a un virus cercano. (28)

APC es un regulador de la vía Wnt y su mutación resulta en disminución de la degradación e incremento de la traslocación nuclear de β -catenina que es el efector de la vía Wnt. Aunque *APC* a menudo se clasifica como un gen supresor, su papel se extiende más allá del arresto del ciclo celular o la apoptosis. *APC* juega un papel central en la transducción de la señalización intrínseca de Wnt en el epitelio intestinal de las células madre colónicas cuyo nicho se ubica en el fondo de las criptas. Induce una respuesta coordinada en el transcriptoma del epitelio intestinal que especifica múltiples aspectos del destino del precursor celular. Por ejemplo, la vía Wnt es un control maestro en las células precursoras de proliferación que rige de forma negativa la expresión de marcadores de diferenciación del epitelio intestinal. Incluso, regula la posición de los precursores celulares por la vía del sistema receptor ligando de EphB/Ephrin-B. Según Sansom (30) la depleción del *APC* resulta en una acumulación nuclear acelerada de β -catenina y grandes alteraciones en la homeostasis epitelial, la vía de señalización Wnt se conserva en varias especies desde nemátodos a mamíferos y juega un papel importante en la proliferación, diferenciación y migración. Wnt estabiliza la β -catenina y luego cuando ésta se acumula en el citoplasma y se trasloca al núcleo, activa al factor de transcripción de células T (Tcf) y luego estimula la expresión de genes incluyendo a *c-myc*, *c-jun*, *fra-1* y ciclina D1. (27).

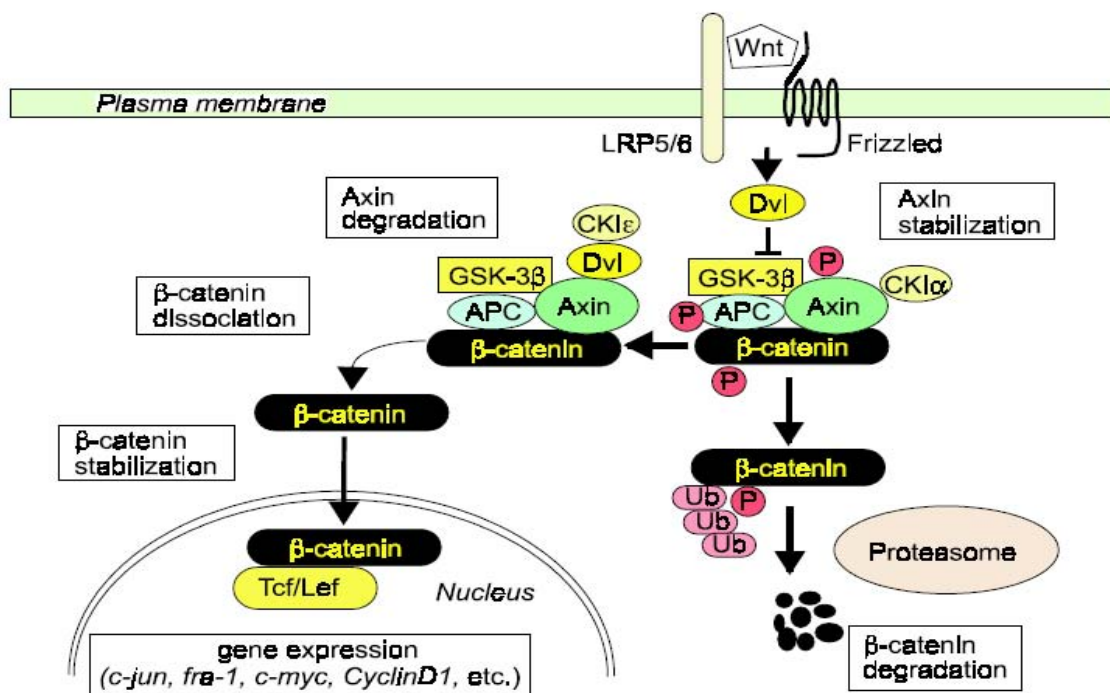


FIGURA No. 1: Vía β -catenina regulada por Wnt. La β -catenina es estabilizada por un complejo multiproteína que contiene a Axina, GSK-3 β , CKI α , y APC en ausencia de Wnt. β -catenina es fosforilada por CKI α y GSK-3 β eficientemente en este complejo y ya fosforilada es ubiquitinada y degradada por el proteasoma. Cuando Wnt se une a su receptor de superficie que consiste en un receptor de 7 dominios transmembrana y al co-receptor LRP5/6. La fosforilación de β -catenina por GSK-3 β es suprimida y consecuentemente se acumula β -catenina en el citosol para después trasladarse al núcleo donde se une y activa a Tcf/LEF, resultando en la expresión de genes blanco donde destaca la ciclina D1 y su consecuente efecto mitogénico. Tomado de 27.

La deficiencia aguda de APC resulta en expansión de la población de precursores celulares debido a incremento de la proliferación de estos y la promoción de la migración a lo largo del eje cripto vellosos. La posición celular se des-regula, conforme ocurre la proliferación de forma independiente de la posición, las Células de Paneth se distribuyen a lo largo del área similar a las criptas contrario a lo que sucede de forma normal cuando se colocan en las bases. La pérdida de APC altera el fenotipo celular con detrimento de las células caliciales, disminuyendo el número de células endocrinas y disipando la expresión de marcadores epiteliales de diferenciación. (25,28).

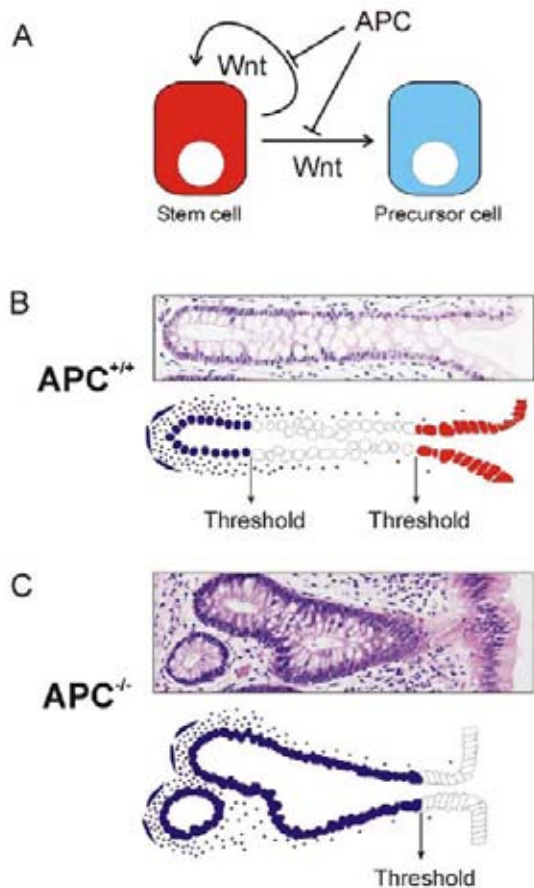


FIGURA No. 2: (A) La vía Wnt determina un precursor celular o un fenotipo de células madre. APC juega un papel importante en la inhibición de la actividad de Wnt así la célula migra hacia arriba del precursor o células madre del nicho. (B) Modelo de señalización posicional regulada por Wnt en una cripta colónica normal. (C) Si APC está mutado, las células no son capaces de apagar la vía Wnt migrando hacia arriba al umbral superior en similares concentraciones por lo que mal interpretan los gradientes Wnt a lo largo del eje de renovación. Como resultado, aún perciben un nivel de señalización de Wnt que es superior al mayor umbral y mantienen el fenotipo de precursor celular. De ésta forma, las células precursoras o madre se acumulan en la cripta con APC mutante que subsecuentemente se expande de forma innumerable. Tomado de 28.

Las mutaciones que activan al oncogen *K-Ras* (un miembro de la súper familia Ras) parecen tomar lugar un poco después de aquellas en el gen *APC*, estas son raras en pequeños pólipos pero comunes en pólipos grandes que muestran alteraciones de la diferenciación celular y en los patrones histológicos. Las líneas celulares de cáncer colo-rectal humano que contienen la mutación de *Ras* muestran características típicas de células transformadas, tales como la habilidad de proliferar sin anclaje a ningún sustrato. La pérdida de genes críticos en cáncer en el cromosoma 18 y las mutaciones en *p53* generalmente ocurren después. Estas mutaciones son raras en los pólipos pero comunes en los carcinomas, sugiriendo, que frecuentemente podrían ocurrir en fases tardías en la secuencia. (29)

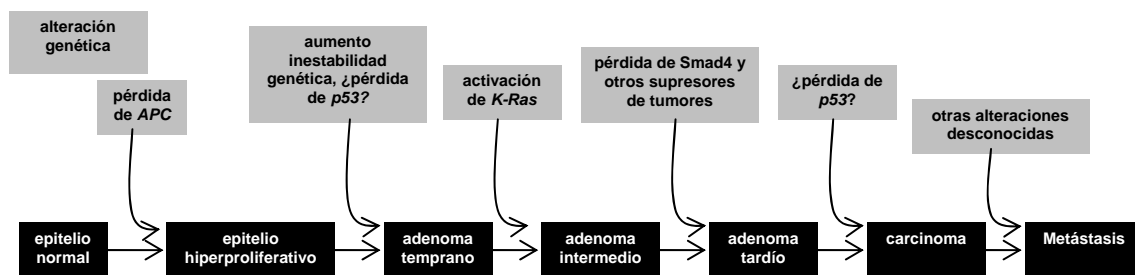


FIGURA 3. Esquema propuesto de progresión tumoral de Vogelstein. (Modificado de 29)

Se cree que la pérdida de la función de *p53* permite a las células anormales no solo a evitar la apoptosis y dividirse, sino también a acumular mutaciones adicionales a una velocidad acelerada debido a la progresión a través del ciclo celular cuando el genoma no están en buenas condiciones para hacerlo creando nuevas anomalías cromosómicas (29).

Con la declaración "Continuamente sucede que la gente come carne llena de gérmenes de tuberculosis y cáncer, así se propagan estas enfermedades y otras que también son graves" Elena White en 1905 fue una de las primeras personas en hacer alusión a la asociación entre el cáncer y la etiología infecciosa. Sin embargo, no fue sino Payton Rous quien en el laboratorio de la universidad de Rockefeller demostró mediante la inyección de un retro virus a pollos que se podía inducir Sarcoma en éstos animales en 1911. Por la importancia de tales experimentos Payton Rous ganó el premio Nóbel en 1966 luego de pasar por el escepticismo de la comunidad científica de la época. El Dr. Wendell Stanley en 1956 en el tercer congreso nacional del cáncer celebrado en Detroit,

fue uno de los primeros en reconocer que “los virus son causantes de la mayoría de todos los cánceres humanos” incluso resumió lo que en la actualidad consideramos que parte de la fisiopatogenia del cáncer cuando dijo: "Es sabido que los virus pueden ocultarse en el cuerpo humano durante años, a veces durante toda la vida; algunos causan problemas, otros no, en algunos casos, los virus del cáncer pueden entrar en actividad debido a circunstancias tales como la edad, la alimentación inadecuada, el desequilibrio hormonal, los productos químicos, las radiaciones o la combinación de todos estos factores capaces de producir tumores malignos".

Actualmente la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (AIIC) reconoce al Virus del Epstein Barr (VEB), Virus de la Hepatitis B y C (VHB y VHC), Virus tipo I de las Células Linfotóxicas T Humanas (VCLT-1) Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo I (VIH-I) y muchos tipos del VPH (incluyendo los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 66) como carcinogénicos del grupo 1 (15,16). La reciente identificación de Herpes Virus como agentes etiológicos del Sarcoma de Kaposi (20,21) pone de manifiesto que es muy probable que diferentes tipos de infecciones virales participen en el desarrollo de tumores malignos en humanos. Hoy se acepta que causan 15-20% de todos los cánceres del hombre y se busca su asociación a la etiología de otros tumores.

La infección por VPH en las mucosas epiteliales provoca neoplasias benignas y en ocasiones malignas. Más de 200 tipos de VHP se han identificado hasta la fecha. Aunque los tipos 16 y 18 son los más relacionados, en el cáncer cérvico-uterino se conoce que los tipos 45, 31, 33, 52, 58, 35, 59 y 56 junto a los 16 y 18 se asocian a la etiología en poco más del 91% (8).

Formado por 8 proteínas, 6 tempranas y 2 tardías el VPH es un virus de ADN con 8000 pares de bases aproximadamente, cada una de las proteínas con varias isoformas juega un papel en su ciclo de vida.

Proteína	Función
L1	Proteína de la cápside mayor
L2	Proteína de la cápside menor
E1	Iniciación de la replicación del ADN viral, Helicasa y ATP
E2	Proteína reguladora de la transcripción, papel auxiliar en la replicación del ADN, mantenimiento del genoma viral
E4	Proteína tardía, Interrumpe las citoqueratinas
E5	Proteína transformadora de membrana, Interactúa con los receptores de los

	factores de crecimiento
E6	Proteína transformadora de virus del papiloma humano, blanco de la degradación de P53, activa la telomerasa
E7	Proteína transformadora de virus del papiloma humano que se une a la proteína retinoblastoma, afecta la duplicación del centrosoma.

TABLA 1: Función de las proteínas de VPH.

El efecto carcinógeno del VPH depende de la integración del genoma viral al ADN de la célula huésped. Cuando el virus se integra se interrumpe al gen que codifica a E2, esto hace que se pierda la proteína E2 que es la encargada de regular la transcripción viral perdiendo así el control de la misma.

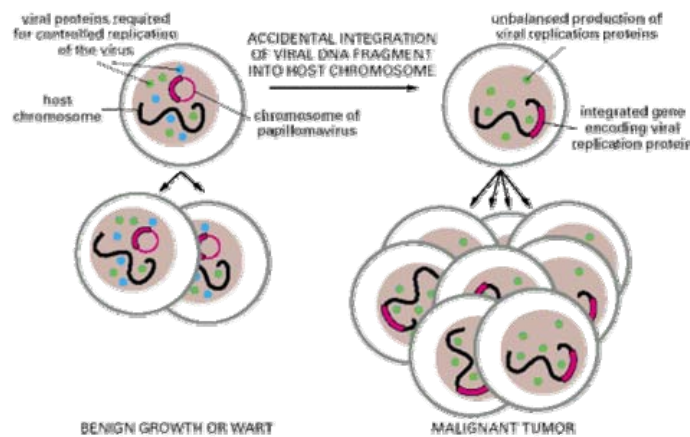


FIGURA No. 4: el virus del papiloma humano tiene una doble cadena circular de ADN con cerca de 8000 pares de bases. En pólipos u otras infecciones benignas, éstos cromosomas se mantienen estables en las células basales del epitelio como plásmidos en forma episomal, donde su replicación está regulada para mantener su vida. (Izquierda) un accidente raro puede provocar la integración de un fragmento de cualquier plásmido al genoma del huésped, alterando el ambiente de los genes virales. Esto (ó por cualquier otra razón) interrumpe el control de la expresión viral génica. La producción no regulada de las proteínas de replicación viral, en especial E2, E6 y E7, interfiere con el control de la división celular, lo que permite la generación del cáncer (Derecha). (29).

Luego, la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, antagonizan la función de las proteínas supresoras de tumores *p53* y *pRb* respectivamente, evitando la apoptosis mediada por *p53* y enviando a la célula a la fase de síntesis de forma inapropiada por la estimulación de ciclinas A y E, paso regulado por *pRb*. Ambos eventos redundan en proliferación celular inadecuada, progresión e inmortalización. Lo anterior se ilustra en el siguiente diagrama.

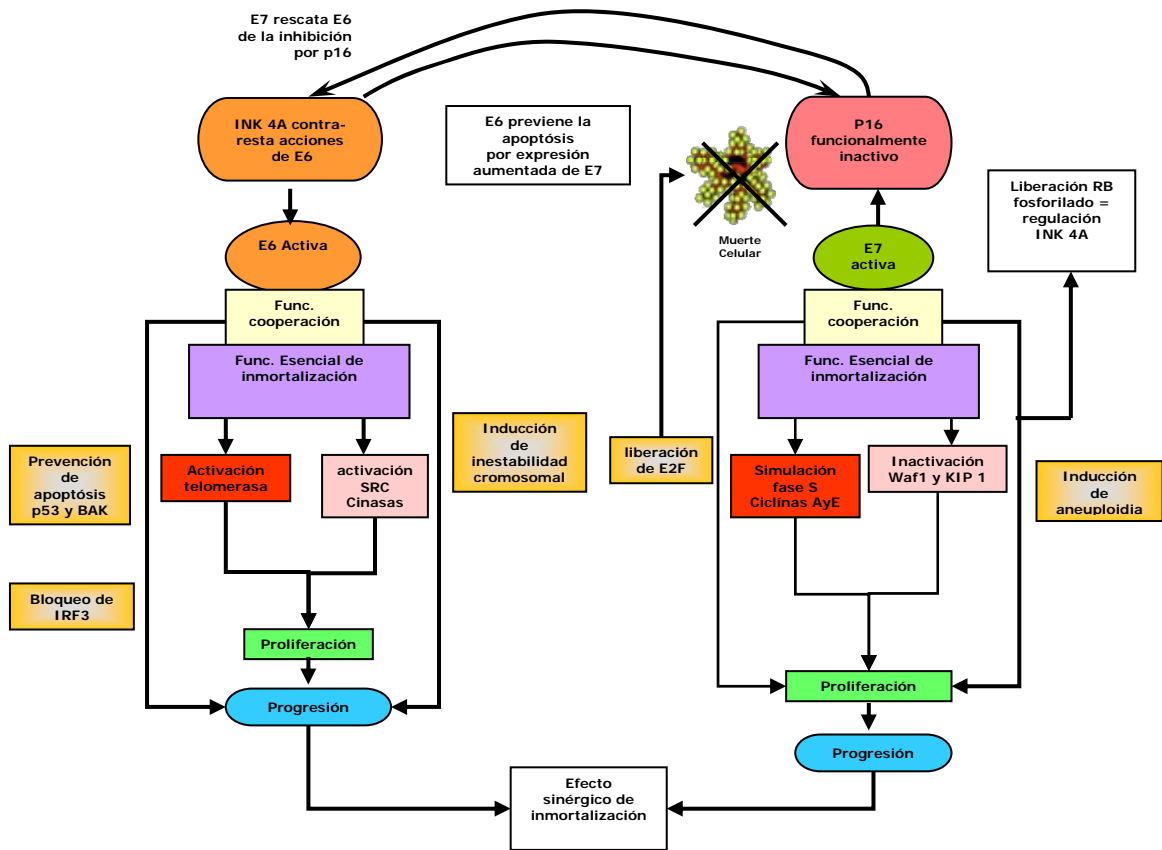


FIGURA No. 5: Efectos sinérgicos de la acción de las proteínas E6 y E7 del VPH en carcinoma cervico-uterino.

Además de su clara asociación oncogénica con el cáncer cervico-uterino algunos tipos de VPH también se han detectado y parecen tener un papel oncogénico en el desarrollo de tumores malignos derivados de epitelios en otros sitios anatómicos. A diferencia de otros virus que requieren de receptores tejido específico para infectar a las células blanco, el VPH parece emplear varias proteínas de membrana como receptores lo que le permite infectar a una gran variedad de epitelios además del cervico-uterino.

El VPH se ha documentado asociado a tumores malignos cutáneos del tipo no melanoma (36). Los informes en cáncer de cabeza y cuello son variables con porcentajes del 10-100% (10,33). En un estudio de 2007 en cáncer pulmonar se ha encontrado a los tipos 16 y 18 así como a las proteínas E6 y E7 en un 20% (9). En el carcinoma de canal anal, se reportó en 2007 su presencia en un 81% (12). En el carcinoma de pene se encontró al VPH en un 55% siendo el tipo 16 el más frecuente, además, en este estudio los autores encontraron actividad transcripcional de E6 (35).

Recientemente se ha detectado ADN viral en tejido de cáncer colo-rectal y en el tejido sano circundante a la lesión maligna por hibridación in situ y PCR, sugiriendo que la infección por virus puede estar asociada con la carcinogénesis de cáncer colo-rectal. En un trabajo publicado por Harkins en 2002 (32) se informa el hallazgo de las proteínas IE1-72 y pp65 de citomegalovirus en 11 de 12 (92%) muestras de células identificadas como adenocarcinoma mediante inmunohistoquímica e hibridación in situ. Existen 5 trabajos internacionales que investigaron la frecuencia de VPH en cáncer colo-rectal (Cuadro 2) (4-7,24). Con las diferentes técnicas de detección, el intervalo va desde 51% hasta 84% de hallazgos positivos, siendo los tipos 18 y 16 los más frecuentemente encontrados con una frecuencia que alcanza hasta un 84% y 68% respectivamente.

Estudio	Técnica	N	n(%)	Tipo VPH
Kirgan D. (USA)	Hibridación In Situ en muestras (+) en IHQ Bloque de parafina	30 colon normal 30 adenomas 30 carcinomas	7(23) 18(60) 29(97)	ND
YuanML. (Taiwan)	PCR Bloque de parafina	19 tejido circundante 19 carcinomas	10(53) 16(84)	VPH 18
Pérez LO. (Argentina)	PCR Bloque de parafina	30 colon normal 54 carcinomas	10(33) 40(74)	VPH 16 (16/40) VPH 18 (13/40) VPH 13 (04/40) VPH 06 (03/40) ND (03/40)
Sohrab B. (USA)	PCR y PCR In Situ Bloque de parafina	10 colon normal 55 carcinomas y tejido circundante	00(00) 28(51)	VPH 16 (31/38) VPH 18 (05/38) VPH 45 (02/38)
Damin DC. (Brasil)	PCR Tejido fresco	30 colon normal 72 carcinomas	00(00) 60(83)	VPH 16 (25/60) VPH 18 (16/60) VPH Mixto (19/60)

TABLA 2: Estudios que evalúan la presencia del genoma del VPH en adenocarcinoma colo-rectal.

Al demostrar la participación del VPH en el desarrollo de cáncer colo-rectal podríamos encaminar la investigación al campo de la prevención y no tanto al campo del tratamiento. Sabemos que 50% de los pacientes tratados con intento curativo y a pesar de la quimioterapia como tratamiento adyuvante recaerán y morirán por esta enfermedad. Peor aún, los pacientes que se encuentran metastásicos al momento del diagnóstico tienen apenas una mediana de supervivencia que va de los 21 a 24 meses incluso con las terapias blancas que han sido aprobadas. Actualmente se ha desarrollado una vacuna cuadrivalente capaz de prevenir la infección de los tipos 6, 11, 16 y 18 del VPH en el cérvix con efectividad cercana al 100%. Con esta se espera eliminar la probabilidad de cáncer cérvico-uterino (17). Aún se desconoce por cuánto tiempo esta

vacuna prevendrá la infección, sin embargo, esperamos contar con esos datos conforme se tenga un seguimiento a largo plazo de estos estudios.

Todo esto justifica que en el INCMNSZ se lleven a cabo estudios para la detección sistemática del VPH en pacientes con cáncer colo-rectal y dar seguimiento a pacientes en riesgo.

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio retro-prospectivo, descriptivo, en el que en forma prospectiva se recolectó un fragmento de tejido en fresco de la pieza quirúrgica (tumor) de pacientes con cáncer colo-rectal que fueron sometidos a resección tumoral en el INCMNSZ durante el período de marzo a julio de 2008. Por otro lado se analizó retrospectivamente el tejido preservado en el banco de tumores del INCMNSZ de 35 pacientes desde 1999 a la fecha. Además, se obtuvieron muestras de tejido normal de colon de pacientes a quienes se les realizó colectomía o colonoscopia de escrutinio o enfermedad inflamatoria del intestino grueso que fueron utilizados como controles, Protocolo 1832 aprobado por el comité de ética del INCMNSZ.

Los pacientes que fueron incluidos en el brazo prospectivo fueron informados del estudio y al acceder se tomó una muestra del tejido fresco extraído durante la cirugía o la colonoscopia. Como control positivo se empleó a las células HeLa que se sabe están infectadas con el tipo 18 de VPH y expresan las oncoproteínas E6 y E7 en muestras de cáncer cérvico uterino. La información obtenida en el estudio fue manejada de forma confidencial y hasta ahora ningún paciente solicitó conocer los resultados de su estudio.

CÁLCULO DE LA MUESTRA: Considerando los trabajos existentes en la literatura sobre el tema (4-7) la frecuencia ponderada del VPH en pacientes con cáncer de colon (ponderación por número de individuos estudiados) es de 72%. Asumiendo que la presencia del VPH en nuestros pacientes tuviera una probabilidad del 50%, con un poder del 80% y un error tipo 1 de 0.05 (2 colas) se requiere estudiar un mínimo de 35 pacientes con cáncer de colon. Para lo anterior se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{p_0 q_0 \left(z_\alpha + z_\beta \sqrt{\frac{pq}{p_0 q_0}} \right)^2}{(p - p_0)^2}$$

CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

- Pacientes con diagnóstico histológico de adenocarcinoma de colon o recto.
- Muestras obtenidas por cirugía o colonoscopia en la fase prospectiva.
- Pacientes con cáncer colo-rectal diagnosticados antes de marzo de 2008 que contaban con tejido congelado en el banco de tumores del instituto.
- Cualquier edad.
- Todos los estadios.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

- Pacientes que se nieguen a proporcionar su consentimiento informado
- Pacientes portadores de poliposis coli
- Pacientes con muestra insuficiente de tejido tumoral o de tejido normal
- Pacientes que no cuenten con tejido en el banco de tumores del instituto
- Pacientes que hayan recibido radioterapia neoadyuvante sin tener tejido previo a ésta
- Pacientes con inmunosupresión

Materiales y Métodos

Se obtuvo el tejido de 41 pacientes con cáncer colon-rectal y el tejido de 25 pacientes sin cáncer. Para valorar la calidad del ADN obtenido y la posibilidad de amplificar un gen que debería estar presente en todos los tejidos, se amplificó un producto de aproximadamente 244pb del gen de Apolipoproteína E (apoE) que puede ser localizado en el cromosoma 1p34 en el Exón 6 de apoEr2. De los 41 tejidos de pacientes con cáncer colo-rectal se pudo amplificar apoE en 35 tumores y en 19 de 25 tejidos de los pacientes sin tumor. Las muestras en las que se amplificó Apo-E se utilizaron para las pruebas subsiguientes y son las que se presentan en los cuadros # 3 y 4.

Cultivo de Células de Cáncer Cérvico Uterino. Las células HeLa fueron donadas por la Dra. María de Jesús Ibarra del INCMNSZ. Las células fueron mantenidas en medio RPMI-1640 con rojo de fenol, suplementado con 10% de suero fetal bovino, y antibióticos y antimicóticos. A estas células se les extrajo el ADN para usarlo como control positivo en las reacciones de PCR.

Tejido de Adenocarcinoma de Colon. En la fase retrospectiva el tejido fue amablemente otorgado por la Dra. Gloria Vizcaíno quien ha reunido estos tejidos para el banco de tumores del instituto. En la fase prospectiva el tejido fue otorgado por el Dr. Quintín H. González Contreras, quien es el Jefe del Departamento de Cirugía de Colon y Recto.

Tejido de Colon Sano. En la fase prospectiva el tejido de colon sano fue otorgado por el Dr. Josué Barahona Garrido, Residente del 3er año de Gastroenterología del INCMNSZ. En la fase retrospectiva el Tejido también fue donado por la Dra. Gloria Vizcaíno.

Reactivos: Master Mix de marca Quiagen, Cat. No. 203443, Lote No. 130. Los oligonucleótidos utilizados para APO E fueron: APO E1: 5'-ACTGGCACTGGGTCGC

TTT-3' y APO E2: 5'-GTTGTTCCCTCCAGTTCCGATT-3'. Los oligonucleótidos para MY 11 y 09 empleados como iniciadores externos para PCR (5'CGTCCMARRGGAWACTGATC3'/5'GCMCAGGGWCTATAAYAATGG3').

Oligonucleótidos para GP5+/GP6- como iniciadores internos (5'TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC3'/5'GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC3') L1C1/2 como iniciadores alternos (5'CGTAAACGTTTTCCCTATTTTTTTT3'/5'TACCCTAAATACTCTGTATTG3'), fueron elaborados por la unidad de biología molecular del IFC de la UNAM. En las secuencias degeneradas "M" corresponde a Adenina o Citosina, "R" corresponde a Adenina o Guanina, "Y" corresponde a Citosina o Timina y "W" corresponde a Adenina o Timina. Los oligonucleótidos con los que se hicieron las pruebas iniciales fueron donados por la Dra. Marcela Lizano del Instituto Nacional de Cancerología. Los reactivos necesarios para la secuenciación y los oligonucleótidos para amplificar APO E fueron otorgados por la Dra. Teresa Tusié Jefa del Laboratorio de biología molecular del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán"

Extracción de ADN de los tejidos y Líneas Celulares. Para la extracción del ADN se utilizó el siguiente protocolo.

1. Con la ayuda de un bisturí se cortó la biopsia hasta deshacer el tejido.
2. Se colocó la muestra a digerir en un tubo eppendorf en 400µl de buffer de lisis y 8µl de proteinasa K y se colocó en baño de maría a 55°C durante toda la noche. Cuando las muestras eran difíciles se utilizó el Bortex para ayudar a digerir la muestra.
3. Al día siguiente y al estar bien digerida la muestra se agregó 400µl de la preparación de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico, se vortexeo por un minuto.
4. Se centrifugó la muestra a 13,000rpm por 10 minutos y se formaron las 2 fases.
5. Se recuperó la fase acuosa y se colocó en otro tubo eppendorf, en el nuevo tubo con la fase recuperada se colocó 400µl de cloroformo-isoamílico, se vortexeo por un minuto.
6. Se centrifugó la muestra a 13,000rpm por 10 minutos y se formaron las 2 fases.
7. Se recuperó la fase acuosa teniendo cuidado de no tomar la interfase, se colocó en un nuevo eppendorf.
8. Se agregaron 800µl de Etanol absoluto y 40µl de Acetato de Amonio frío y se mezcló manualmente para ver la formación de la hebra.
9. Se colocó a -70°C durante 2 horas para precipitar el ADN.

10. Se centrifugó a 13,000rpm por 30 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante.
11. Se agregó al pellet 250µl de etanol al 70% frío y se lavó agitando suavemente.
12. Se centrifugó a 13,000rpm por 10 minutos a 4°C (los pasos 11 y 12 se repitieron 2 veces)
13. Se desechó el sobrenadante, se secó el pellet y estando seco se resuspendió en agua estéril inyectable según el tamaño del pellet.
14. Se cuantificó en NanoDrop[®] de 260-280nm.

Técnica de PCR. Protocolo de amplificación de APO E: 1µl de templado de ADN a concentración de 50ng/µl, 5µl de Master Mix, 2µl de los oligonucleótidos APO E1 y APO E2, 7µl de H₂O para completar una reacción de 17µl.

Protocolo de amplificación de MY: 4µl de templado de ADN a concentración de 50ng/µl, Master Mix 4µl, oligonucleótidos MY 11 y 09 1µl de cada uno en concentración de 60ng/µl, Agua bidestilada para completar una reacción de 16µl.

Para el protocolo de amplificación de GP se utilizaron dos diferentes concentraciones de los oligonucleótidos:

Protocolo # 1: 3µl de templado de ADN a concentración de 50ng/µl, Master Mix 4µl, Oligonucleótidos GP 05 y 06 1µl de cada uno en concentración de 60ng/µl, Agua bidestilada para completar una reacción de 15µl.

Protocolo # 2: 3µl de templado de ADN a concentración de 50ng/µl, Master Mix 4µl, Oligonucleótidos GP 05 y 06 0.5µl de cada uno en concentración de 60ng/µl, Agua bidestilada para completar una reacción de 15µl.

Los protocolos de térmociclado para la amplificación del ADN fueron así: Oligonucleótidos MY's Paso No. 1. 94°C por 10', Paso No. 2. 94°C por 50'', Paso No. 3. 55°C por 50'', Paso No. 4. 72°C por 55'', Paso No. 5. 72°C por 7', Paso No. 6. 4°C tiempo indefinido. Los pasos 2 al 4 se repitieron 40 veces.

Oligonucleótidos GP's Paso No. 1. 94°C por 10', Paso No. 2. 94°C por 60'', Paso No. 3. 40°C por 120'', Paso No. 4. 72°C por 90'', Paso No. 5. 72°C por 7', Paso No. 6. 4°C tiempo indefinido. Los pasos 2 al 4 se repitieron 40 veces.

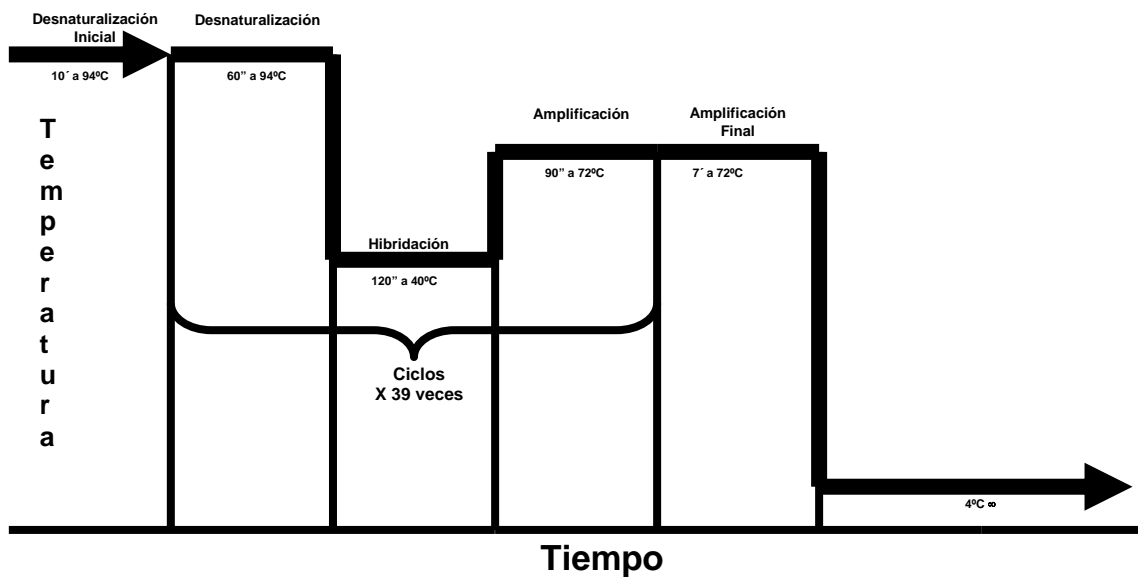


FIGURA 6. Protocolo de amplificación para los productos denominados GP.

Los productos de PCR para GP's son de un valor aproximado de 116 pares de bases (pb) y para MY's de más o menos 452pb.

Secuenciación. Se realizó la purificación por el método de columnas así:

1. Se colocó buffer PB en relación 5:1 con la muestra.
2. Se pasó a la columna.
3. Se centrifugó a 12,000rpm x 1' y se desechó el líquido.
4. Se colocó 600µl buffer PE en la columna.
5. Se centrifugó a 12,000rpm x 1' y se desechó el líquido.
6. Se centrifugó a 12,000rpm x 1'.
7. Se colocó nuevo tubo eppendorf y se adhirió 15µl de agua y se esperó 5 minutos.
8. Se centrifugó a 12,000rpm x 1'.
9. Se corrió gel de agarosa al 2% con 1µl de la reacción + 1µl de buffer para valorar la posibilidad de amplificación
10. Se realizó nueva PCR así:
 - a. Buffer 3µl.
 - b. Big Dye 0.5µl.
 - c. Oligonucleótidos (según la cantidad colocada en la primera PCR).
 - d. ADN (según la calidad vista en el gel corrido en el paso 9).
 - e. H₂O para completar una reacción de 20µl.
11. El producto de PCR se llevó al secuenciador.
12. Se obtuvieron los resultados y se identificó al virus.

Las secuencias se obtienen de la PCR realizada con Big Dye, que al unirse a las pares de bases les confiere fluorescencia que se lee por el secuenciador (Modelo 3100 de Applied Biosystems). En las secuencias “Sentido” los colores corresponden a: verde = A (Adenina), rojo = T (Timina), azul = C (Citosina) y negro = G (Guanina). Para las secuencias antisentido se debe leer la base complementaria así: Adenina por Timina y viceversa, Guanina por Citosina y viceversa.

Características de los pacientes y controles. Las características de los pacientes y de los controles se muestran en las tablas 3 y 4.

PACIENTES INCLUIDOS

Casos

#	RM	Edad	Género	Sitio Primario	Estadio	Condición Actual	Tratamiento
1	153980	70	F	Sigmoides	IV	Viva	Qx + Qt
2	185876	77	M	Recto	I	Vivo	Qx
3	186859	66	F	Descendente	IIIB	Muerta	Qx + Qt
4	188558	19	M	Sigmoides	IV	Muerto	Qx + Qt
5	172158	83	F	Ascendente	IIA	Muerta	Qx
6	188411	65	M	Sigmoides	IV	Muerto	Qx + Qt
7	190934	68	M	Ascendente	IV	Muerto	Qx + Qt
8	192358	53	M	Recto Sigmoides	IIA	Vivo	Qx
9	205078	60	M	Descendente	IIA	Vivo	Qx
10	205138	63	F	Ascendente	IIIB	Muerta	Qx + Qt
11	205212	89	F	Sigmoides	IIA	ND	No acudió a vigilancia
12	205488	82	F	Sigmoides	IIA	Viva	Qx
13	205512	76	M	Descendente	IIA	Vivo	Qx + Vigilancia
14	205556	74	F	Ascendente	IIA	Viva	Qx
15	120898	58	F	Descendente	I	Viva	Qx
16	207812	61	M	Descendente	IIA	Vivo	Qx
17	208516	72	M	Recto	IV	Muerto	Qx + Qt
18	208762	78	M	Ascendente	I	Vivo	Qx
19	209432	66	F	Recto	IV	Muerta	Qx + Qt
20	205202	77	M	Descendente	IIIB	Vivo	Qx + Qt
21	208177	78	F	Recto	IV	Muerta	Qx + Qt
22	210453	77	F	Sigmoides	IIIB	Muerta	Qx + Qt
23	238509	37	M	Unión Ano Rectal	I	Vivo	Qx
24	134593	67	M	Descendente	Localizado	Vivo	Solo biopsia
25	091472	55	F	Recto	IIIB	Viva	QRt
26	205610	66	M	Sigmoides	IIB	Vivo	Qx + Vigilancia
27	238403	55	M	Ascendente	IIIB	Vivo	Qx + Qt
28	238312	64	M	Recto Sigmoides	IIA	Vivo	Qx
29	230771	55	F	Recto	IIB	Viva	Qx + Vigilancia
30	238905	51	M	Sigmoides	IV	Vivo	Qx + Qt
31	142002	69	M	Sigmoides	Ila	Vivo	Qx
32	174871	65	F	Ascendente	Localizada	Viva	No ha recibido Qx aún
33	131398	67	F	Ascendente	IV	Muerta	Qx + Qt
34	205779	80	F	Descendente	IIA	Nº	No acudió a vigilancia
35	207814	77	M	Sigmoides	IIA	Muerto	Qx

TABLA 3: Características de los pacientes con adenocarcinoma de colon.

Controles sin Cáncer

#	RM	Edad	Género	Sitio Primario
1	RMG	59	F	Colonoscopia de escrutinio
2	225336	44	M	Escrutinio, Colitis crónica.
3	230471	45	M	Escrutinio.
4	211866	68	M	Escrutinio.
5	199373	41	M	Escrutinio, Colitis crónica.
6	209983	26	M	Poliposis adenomatosa familiar.
7	238682	73	F	Escrutinio estreñimiento crónico.
8	186748	67	M	Melanoma.
9	PV	72	F	Escrutinio.
10	PD	56	F	Escrutinio.
11	193008	78	F	Escrutinio.
12	225972	59	F	Escrutinio.
13	RC	81	M	Escrutinio.
14	162775	42	F	Gastroenteritis.
15	166122	39	F	Escrutinio
16	156649	88	F	Pérdida de peso
17	223543	51	M	Escrutinio.
18	175789	48	M	Colitis crónica.
19	177208	73	M	Escrutinio.

TABLA 4: Características de los controles.

RESULTADOS

Amplificación de Apolipoproteína E como control de calidad del ADN de las muestras. Con el fin de asegurar la posibilidad y calidad de amplificación del ADN extraído de las diferentes muestras (tumores crío preservados, muestras frescas y células cultivadas) se decidió amplificar una sección del gen de Apolipoproteína E independiente a la infección con VPH. La reacción de PCR generó el producto de amplificación del tamaño esperado (252pb) en el ADN de células HeLa y en el ADN de los pacientes 16 y 34. (Figura 7).

Evaluación de Calidad del ADN En células HeLa y muestras de Tumores

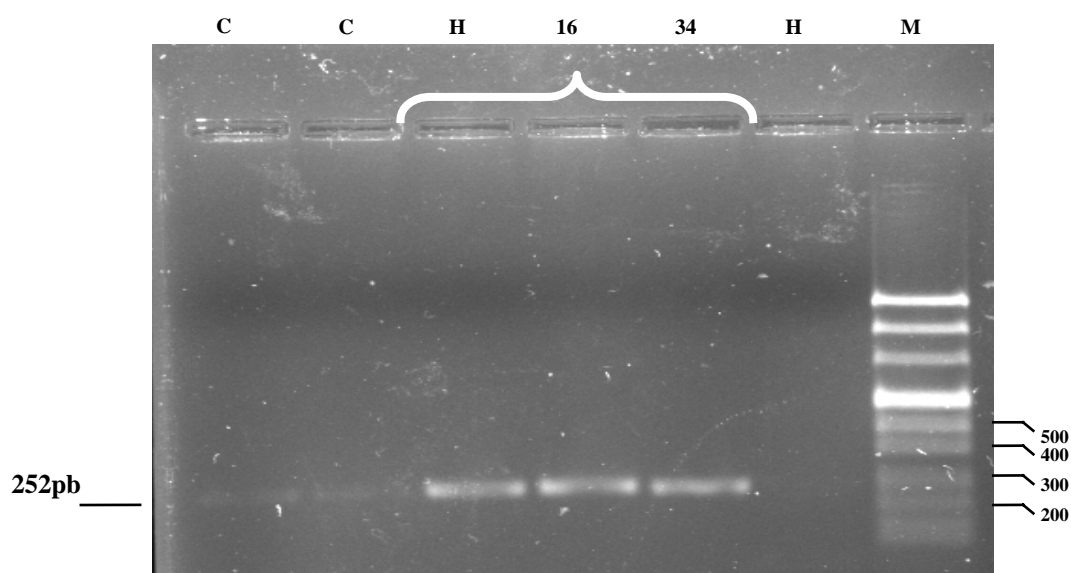


FIGURA 7: Gel positivo para células HeLa y los pacientes 16 y 34 para un fragmento de APO E de 252pb. INTERPRETACIÓN: C: Carriles 1 y 2 muestras de ADN obtenidas de sangre periférica de un donador normal. H: Carril 3, Células HeLa. Carriles 4 y 5 muestras de ADN de pacientes con tejido Crió preservado. H: Carril 6 control negativo de la reacción sin ADN. Carril 7: Marcador de peso molecular. El gel se corrió con 10µl del producto de PCR + 1µl de Buffer de corrida y 1µl de Bromuro de Etídio para un total de 12µl. MPM: Marcador de peso molecular.

Todas las muestras de pacientes y controles (66) se sometieron a amplificación para APO E. En 12 (18.2%) no se pudo amplificar el gen y fueron excluidas. (Datos no mostrados).

Para verificar que el amplicón de APO E correspondía a lo esperado se secuenciaron los productos de PCR de 5 de 54 pacientes elegidos al azar. La figura 8. Muestra un electroferograma representativo de los 5 secuenciados.

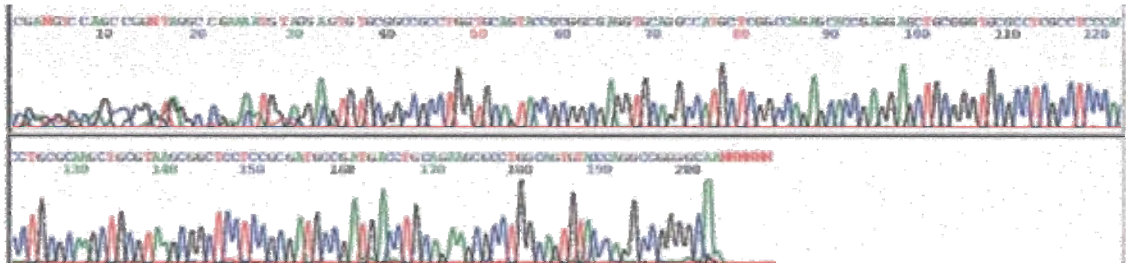


FIGURA 8: Electroferograma con la secuencia “Sentido” del producto de PCR APO E del paciente 16.

Al comparar la secuencia del producto de PCR con la secuencia de APO E reportada en NCBI confirmamos la identidad de la banda de 252pb. La secuencia sentido arrojó 176 nucleótidos que al ser comparada con la secuencia reportada solo difirió en 2 bases que el programa de secuenciación no pudo definir y por lo tanto aparecen como letras “N”.

```
Paciente
TGTGCGGNCGCCTGGTGCA■TACCGCGGCAGGTCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCC
APO E NCBI.
TGTGCGGCCCGCTGGTGCA■TACCGCGGCAGGTCAGGCCATGCTCGGCCAGAGCACCGAGGAGCTGCGGGTGCGCCTCGCCTCCC

Paciente
ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGC
APO E NCBI.
ACCTGCGCAAGCTGCGTAAGCGGCTCCTCCGCGATGCCGATGACCTGCAGAAGCGCCTGGCAGTGTACCAGGCCGGGGC
```

FIGURA 9. Alineamiento de la secuencia “Sentido” de APO E obtenida del paciente 207812 comparada con la secuencia publicada en el NCBI (segundo renglón). Las cajas marcadas en rojo son posiciones en las que las secuencias difieren. Las posiciones marcadas como N representan bases que el programa no pudo identificar.

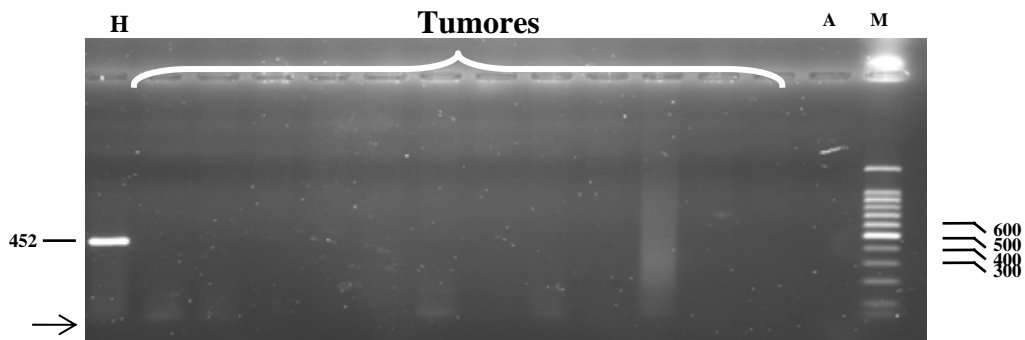
Estos resultados en conjunto representan un control de calidad que certifica que el ADN de las 54 muestras que se utilizaron posteriormente para amplificar VPH no presentan ningún contaminante o que no tengan la pureza necesaria, lo que pudiera interferir con el protocolo general de amplificación.

Determinación de VPH con Oligonucleótidos MY en pacientes con adenocarcinoma de colon y en controles.

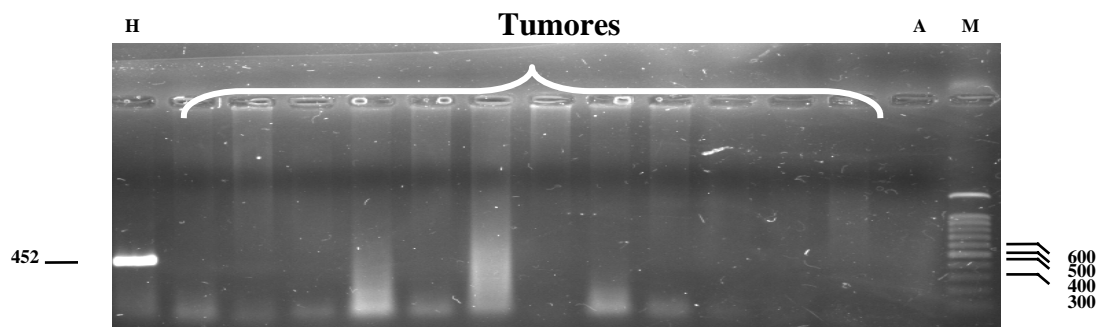
En la figura 10 se observan los resultados de la búsqueda de VPH en pacientes y en controles. El producto de PCR (control positivo de la reacción) para las células HeLa se observa como una banda intensa en la posición aproximada de 452 pb, el control con agua de la reacción es negativo y no se encontró ningún resultados positivo en los pacientes con adenocarcinoma colo-rectal (figuras 10a-c) ni en los controles (figura 10d).

FIGURA 10

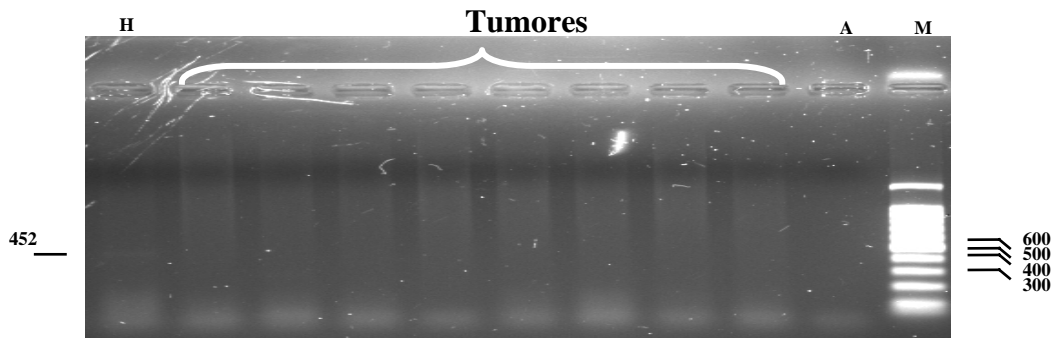
a) Protocolo MY Pacientes 1-12



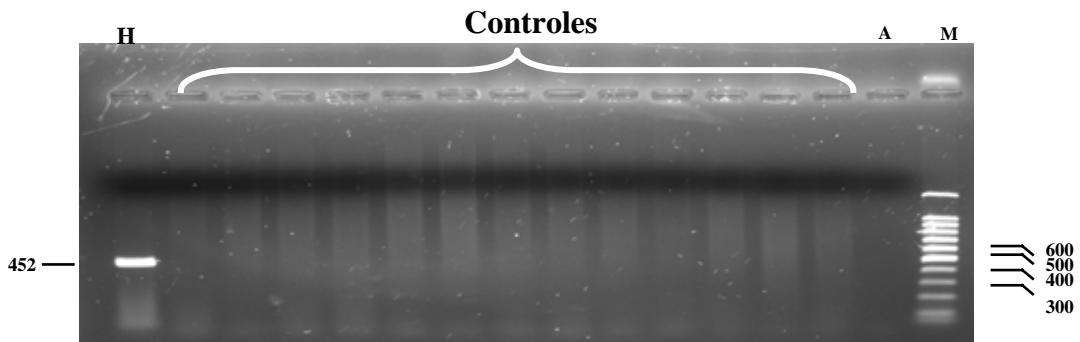
b) Protocolo MY Pacientes 13-24



**c) Protocolo MY
Pacientes 25-32**



**d) Protocolo MY
Controles 1-12**



Geles negativos para la amplificación de oligonucleótidos MY en ADN de los pacientes 1-35 con adenocarcinoma colo-rectal (Tabla 3). INTERPRETACIÓN: HeLa (H): Línea Celular derivada de cáncer cérvico uterino con secuencias integradas del virus del papiloma humano tipo 18 con 10-50 copias (34). Utilizada como control positivo de la reacción. H₂O (A): Reacción de PCR donde no se coloca ADN sino sólo agua. Utilizada como control negativo de la reacción. 452: A la izquierda, el tamaño esperado del producto de PCR. Los geles se corrieron con 5µl del producto de PCR + 1µl de Buffer de corrida y 1µl de Bromuro de Etídio para un total de 7µl. Marcador de peso molecular (M). En la parte inferior la → corresponde a los Oligonucleótidos no incorporados.

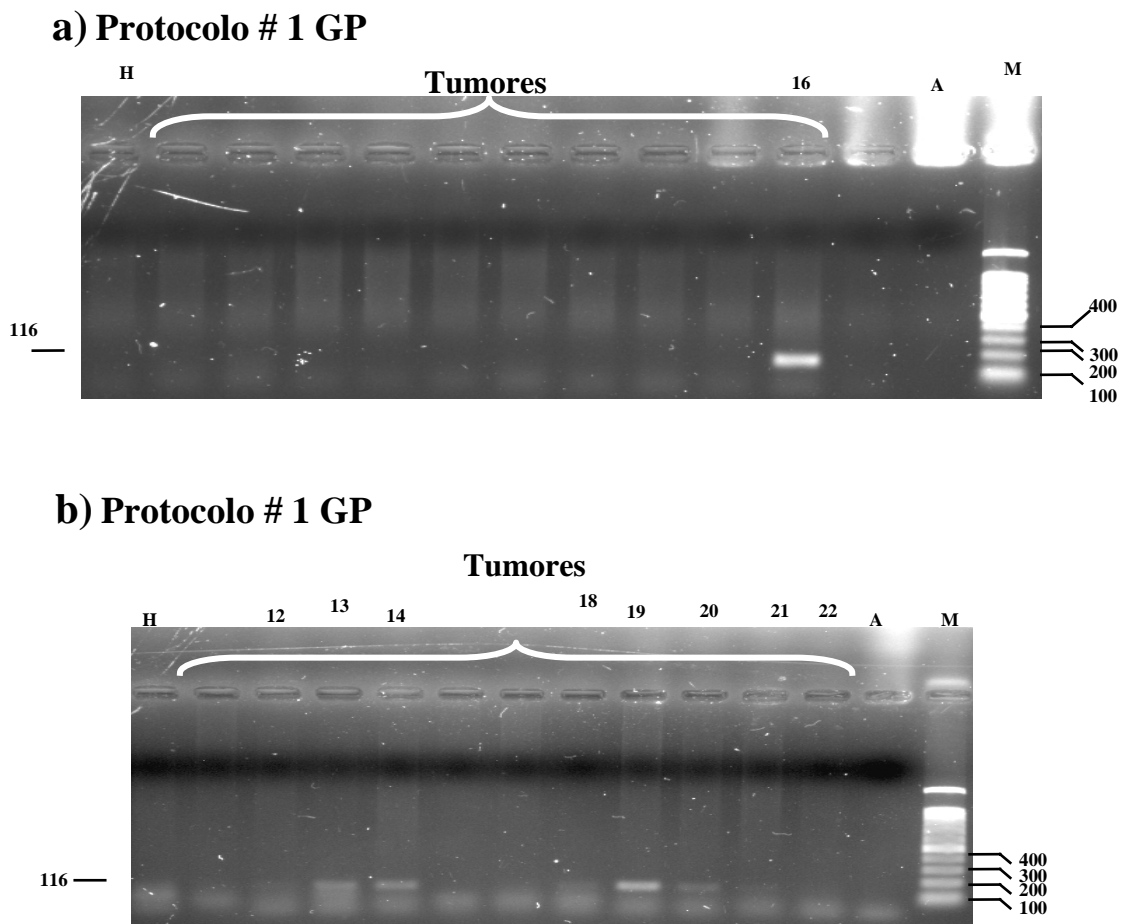
Determinación de VPH con Oligonucleótidos GP en pacientes con adenocarcinoma de colon y en controles. Protocolos No. 1 y 2.

En la figura 11 y 12, se observan los resultados de la búsqueda de VPH en pacientes y en controles. Igual que en la sección anterior, el producto de PCR (control positivo de la reacción) para las células HeLa aparece como una banda intensa en la posición aproximada de 116 pb, el control con agua de la reacción es negativo.

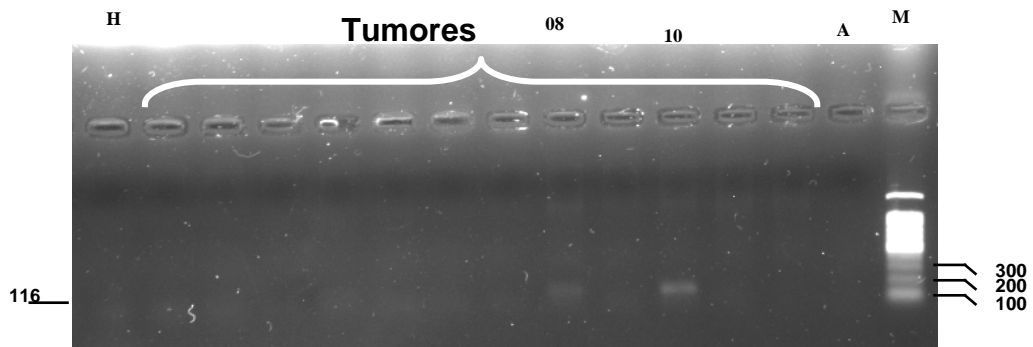
Con el protocolo #1 se encontraron resultados positivos en el paciente 16 (figura 11a), así como en los pacientes 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21 y 22 (figura 11b).

Con el protocolo #2, se encontraron resultados positivos en los pacientes 8, 10 (figura 11c) y 17 (figura 11d) además de los encontrados con el protocolo #1. De los controles, sólo en el paciente número 10 se obtuvo producto de PCR tanto en el protocolo #1 como en el #2 (figuras 12a y b).

FIGURA 11



c) Protocolo # 2 GP



d) Protocolo # 2 GP

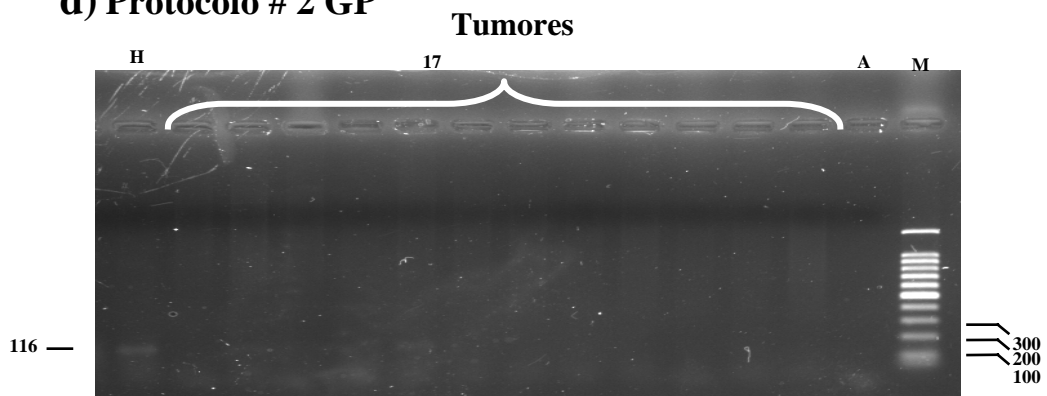
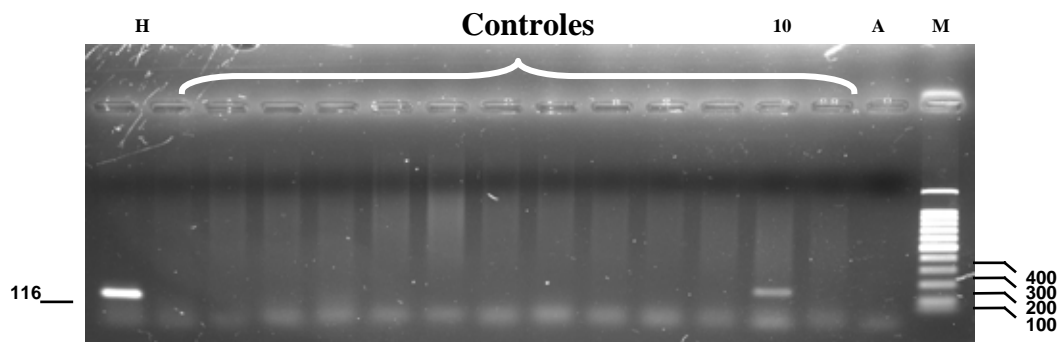
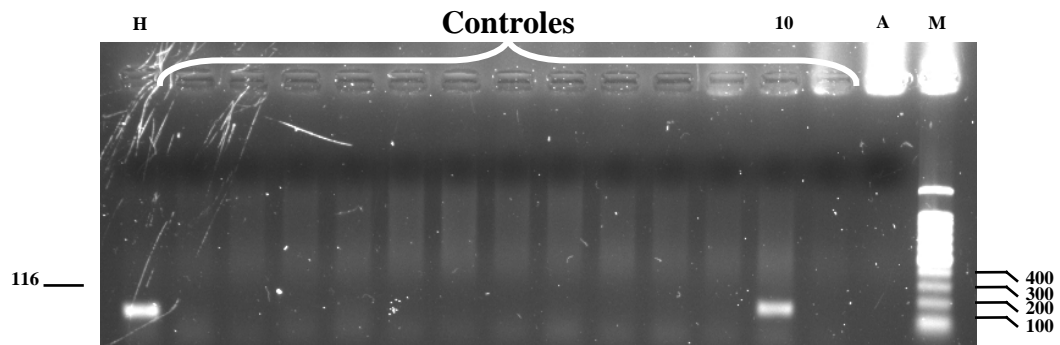


FIGURA 12

a) Protocolo # 1 GP



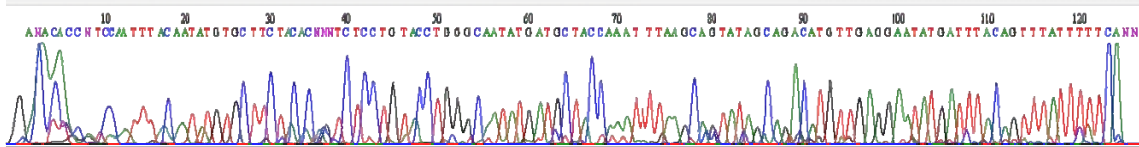
b) Protocolo # 2 GP



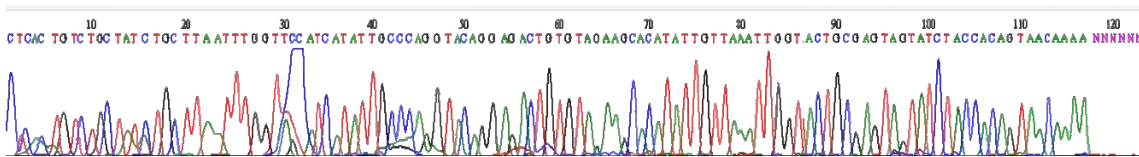
Secuencia de los productos de PCR generados con los Oligonucleótidos GP (GP05 y GP06) en células HeLa. En la figura 14 se observan las secuencias de los productos de PCR “Sentido” (GP5) y “Antisentido” (GP6) de células HeLa (figuras 14a y b respectivamente).

FIGURA 14:

a)



b)

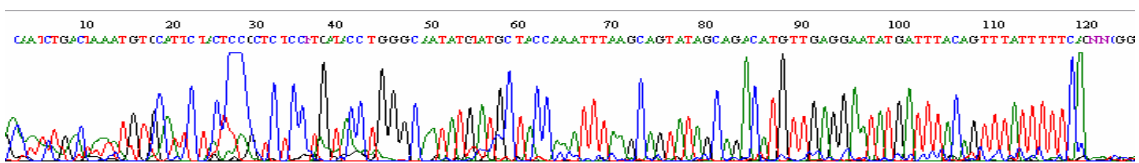


Secuenciación de productos de PCR GP en pacientes con adenocarcinoma colorectal. En la figura 15 se observan las secuencias “Sentido” (GP 5) y “Antisentido” (GP6) de los 7 pacientes en los que se obtuvo un producto de PCR (8, 10, 16, 17, 18, 19 y 20) (Tabla 3).

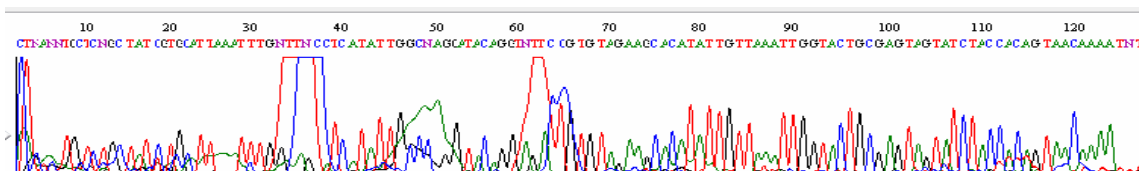
En las figuras 15a y b se muestran las secuencias “Sentido” y “Antisentido” del paciente No. 8 (Tabla 3). En las figuras 15c y d se muestran las secuencias “Sentido” y “Antisentido” del paciente No. 10 (Tabla 3), las figuras 15e y f corresponden a las secuencias “Sentido” y “Antisentido” del paciente No. 16 (Tabla 3). De los pacientes 17 y 18 (Tabla 3) únicamente se obtuvo la secuencia “Sentido” (figuras 15g y h). Del paciente No.19 obtuvimos tanto la secuencia “Sentido” como “Antisentido” (figuras 15i y j respectivamente). Del paciente No. 20 sólo obtuvimos la secuencia “Antisentido” (figura 15k).

FIGURA 15:

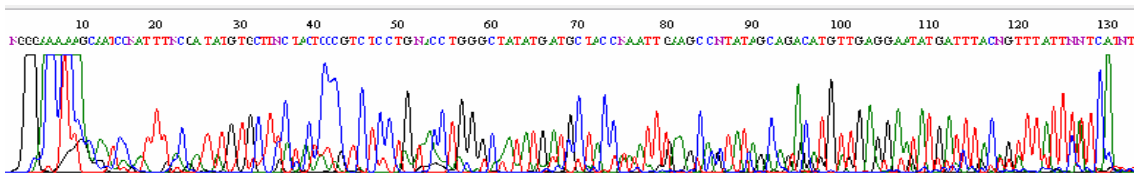
a)



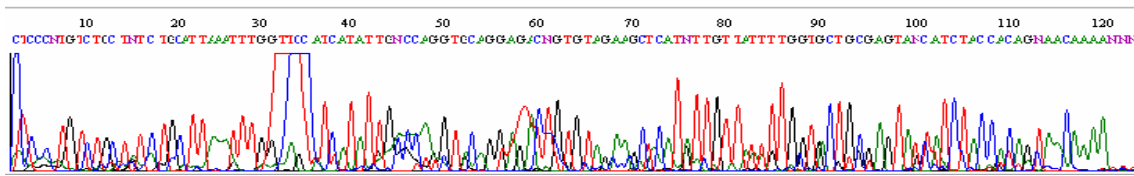
b)



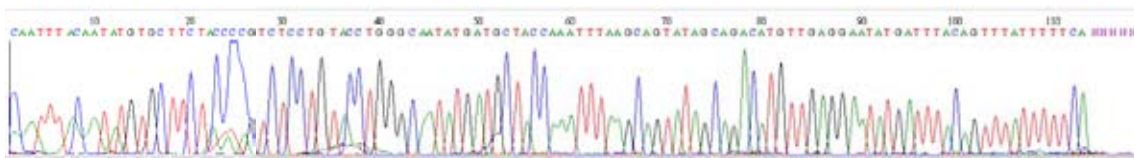
c)



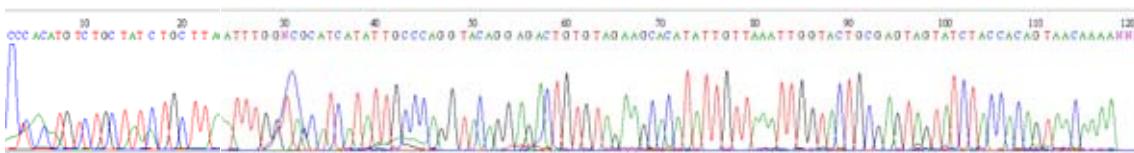
d)



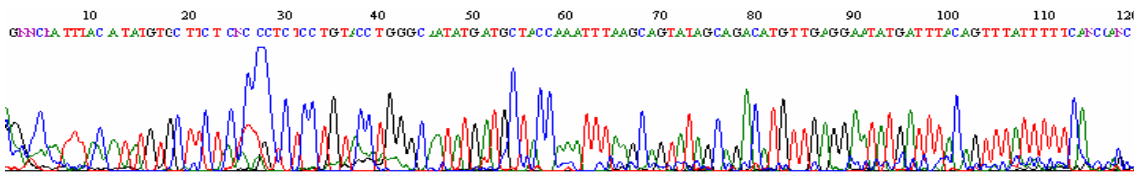
e)



f)



g)



h)

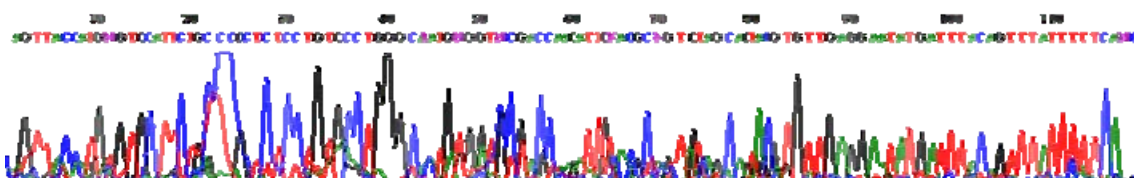


FIGURA 17

a)

	GP5		GP6
	TTTGTACTGTGGTAGATA CCACTCCCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATA		TGATTTCAGTTTATTTTT
HeLa	ANACACNTCCAATTTA CAATATGTGCTTCTACACNNNTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATA		TGATTTACAGTTTATTTTT
8	AAACANCGTCATTTACN NATATGTGCTTCTACACCNTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATA		TGATTTACAGTTTATTTTT
10	CAATCTGACTAAATGTGCATTCTACTCCGCTCTCCNTGATAC TGGGCAATATGTATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATA		TGATTTACAGTTTATTTTT
16	NGGGAAAAGCAATCCNATTTNCGATATGTGCTTCTACTCCGCTCTCCTG ACCTGGGCTATATGATGCTACC NAATT GAAGCC NATAGCAGACATGTTGAGGAATA		TGATTTACAGTTTATTTTT
17	CAATTTA CAATATGTGCTTCTACT CCGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATA		TGATTTACAGTTTATTTTT
18	GNNCNATTTACATATGTGCTTCTNNNC NCC TCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATA		TGATTTACAGTTTATTTTT
19	AGTTACCATGNGTGCATTCTGC CCGTCTCCTGT CCGTGGGCA NATNGCTNCGACCAA ATTGNACGC NGT TAGCAGTAC TGTGAGGAATA		TGATTTACAGTTTATTTTT
Control (10)	ACACANCGTCCATTTACNATATGTGCTTC CNCCNCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATA		TGATTTACAGTTTATTTTT

b)

	GP5		GP6
	TTTGTACTGTGGTAGATA CCACTCCCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATTTAAGCAGTATAGCAGACATGTTGAGGAATA		TGATTTCAGTTTATTTTT
TTTGTCTGTGGTAGATA	C ACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTC ATCAC GTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCTACCAAATT NAGCAGTATNGCAGACATGTGAG		HeLa
TTTGTACTGTGGTAGATA	C ACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACAC G AANA CCTGTA CCTNGCCAATATGAG GNAANCAAATTTAA TGCAG ATAGCN GAGCANNTNAG		192358
TTTGT CTGTGGTAGAT	G N ACTCGCAG ACCAA AATAACAA NATG GCTTCTACACNGTCTCCTG ACCTGG NCAATATGATG AACCAAATTTAA TGCAG ANAGCAGACAN GCGAG		205138
TTTGTACTGTGGTAGATA	C ACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCTCCTGTACCTGGGCAATATGATGCG NCCAAATTTAAGC AGATAGCAGACATGT GGG		207812
TTTGTACTGTGGTAGATA	C ACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAG NCA CCTGTACCTGGNCA NTATGATG GGGNCAAAT AAGC ACATAGCAGACA TTAG		209432
TTTGTACTGTGGTAGATA	C ACTCGCAGTACCAATTTAACAATATGTGCTTCTACACAGT TCCTGTACCTGG NCAATATGATG GGAANCAAATTAAGC AGATAGCA		205202
TTTGTACTGTGGTAGATA	C ACTCGCAGTACCAA NTAACAATATGTGCTTCTACACAGTCT CTGTACCTGGGCAATATGATGCG GGACAAAT AAGC AGATAGCAGACATGT GAG		PD (Control)

(a) Alineamiento de las secuencias “Sentido” de 6 pacientes (renglones 3 a 8) y un control (renglón 9) (Tablas 3 y 4). La secuencia del primer renglón corresponde a la reportada para el gen L1 de VPH18 (40), y la del segundo renglón a la obtenida en el ADN de células HeLa. Los oligonucleótidos empleados para amplificar este fragmento aparecen subrayados y están marcados como GP5 (sentido) y GP6 (antisentido). (b) Alineamiento de las secuencias “Antisentido” de 5 pacientes (renglones 3 a 7) y un control (renglón 8) (Tablas 3 y 4). La secuencia del primer renglón corresponde a la reportada para el gen L1 de VPH18 (40), y la del segundo renglón a la obtenida en el ADN de células HeLa. Las secuencias subrayadas en esta sección corresponden a un alto grado de identidad al compararse con la secuencia tipo (primer renglón), las cajas marcadas en rojo son posiciones en las que las secuencias de los pacientes o del control difieren de la secuencia tipo (primer renglón). Las posiciones marcadas como N representan bases que el programa no pudo identificar.

Las secuencias identificadas tanto en las células HeLa así como en las biopsias de adenocarcinomas y del control corresponden a la secuencia del tipo VPH18 publicada en NCBI. La figura 17 muestra el alineamiento de las secuencias de las células HeLa, 6 pacientes y un control comparadas con la secuencia patrón de VPH18 (40). Dado que son secuencias obtenidas con el oligonucleótido “Sentido” parte de la secuencia del extremo 5’ se pierde y en todos los casos se obtuvo una secuencia clara para el extremo 3’. La parte faltante de la secuencia se obtuvo con las secuencias “Antisentido” (datos no mostrados). La secuencia de las células HeLa mostró una identidad en 95 de 109 bases (87 %). Por otro lado, la secuencia del paciente 8 mostró una alta identidad con la secuencia patrón con 9 bases diferentes de 101 (89 %), mientras que la secuencia del paciente 10 mostró la menor identidad con 39 bases diferentes de 97 (60%). La secuencia del paciente 19 presentó el mayor número de variaciones puntuales al compararse con la secuencia patrón con 17 diferencias en 95 posiciones (18 %).

En conclusión, en el presente estudio se encontraron 12 de 35 (34.2%) pacientes positivos para VPH y únicamente a 1 de 19 controles (5.2%). La diferencia alcanza significado estadístico según el análisis de Fisher a doble cola, con un intervalo de confianza de 95% que va de 0.19 a 0.52.

DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el presente estudio en donde se investigó la presencia de VPH en 35 pacientes con cáncer colo-rectal y en 19 pacientes sin adenocarcinoma colo-rectal utilizados como controles, no obtuvimos productos de PCR con los oligonucleótidos MY tanto para los pacientes como para los controles. Con los oligonucleótidos GP con los dos protocolos de mezcla para la amplificación, obtuvimos un producto de PCR del tamaño esperado (116 pb) y con a secuencias correspondiente al tipo VPH 18 en 12 de 35 pacientes con cáncer colo-rectal lo que equivale al 34.2%; en los controles encontramos el mismo producto de PCR en uno de diecinueve pacientes lo que corresponde al 5.3%, diferencia que fue estadísticamente significativa ($p:0.021$ de acuerdo al análisis de Fisher a doble cola, con un intervalo de confianza de 95% y rango de 0.19 a 0.52).

Lo anterior demuestra que en pacientes con cáncer colo-rectal la infección por VPH es 9.39 veces más frecuente que en la población sin una neoplásia maligna colónica. Respecto a las características de los pacientes con adenocarcinoma colo-rectal e infección por VPH, podemos decir que no hubo predominio de género, ya que de los 12 pacientes 6 fueron masculinos y 6 femeninos. En cuanto al grado de diferenciación, 6 pacientes tuvieron un tumor moderadamente diferenciado, 3 tumores bien diferenciados, 2 tumores bien a moderadamente diferenciados y un solo paciente presentaba un tumor mucinoso de alto grado de diferenciación. De los pacientes con VPH uno se diagnosticó en estadio I, cinco en estadio IIA, tres en estadio IIIB y tres en estadio IV. Con una mediana de seguimiento de 6 años el 42% falleció a consecuencia del cáncer (tres pacientes se encontraban en estadio IV y dos en estadio IIIB que posteriormente recayeron y murieron) y 58 % (uno en estadio I, cinco en estadio IIA y uno en estadio IIIB) se encuentran vivos y sin evidencia de enfermedad.

El porcentaje de infección por VPH en cáncer colo-rectal encontrado en nuestro estudio es menor a lo reportado en la literatura. Kirgan (24) en su estudio con hibridación in situ realizada en pacientes con inmunohistoquímica positiva para VPH encontró su genoma en 97% de 30 pacientes con carcinoma. Sohrab (5) en su estudio con PCR in situ encontró al ADN viral en 51% de 55 pacientes. Otros autores reportaron la presencia del VPH en tejido de adenocarcinoma colo-rectal en promedio en 80% de los casos (4,6,7). Estas diferencias pueden ser secundarias a diferentes factores. Es posible que existan diferentes tasas de infección de acuerdo al área geográfica o a diferencias étnicas. No se puede excluir diferencias en cuanto a la eficiencia para amplificar el genoma viral de los

oligonucleótidos utilizados, o diferencias en la técnica empleada (método de aislamiento del ADN y mezclas de reacción empleadas en la PCR). Por otro lado, las muestras de tejido tumoral que fueron obtenidas antes del 2002 no llevaron un proceso óptimo de crió preservación, lo cual pudo influir negativamente en los resultados. De hecho, de las muestras que se procesaron previas a esa fecha, únicamente en una se detectó la presencia de VPH. La secuencia identificada en el producto de PCR de ADN de células HeLa coincidió con la secuencia tipo en un 87%, el paciente 8 presentó la identidad más alta (88%) y el 205138 la más baja (60%) (Figura 17). Esta variación sugiere subtipos del VPH 18 y minimiza la posibilidad de contaminación entre las muestras y las células HeLa. No deja de ser llamativo que en nuestro estudio no se hayan detectado secuencias de VPH16, siendo el de mayor prevalencia en cáncer cérvico uterino, en cáncer de cavidad oral (10), de pene (35) y de canal anal (12). Sólo uno de los estudios previos en cáncer colo-rectal reportó la presencia exclusiva de VPH18 (6), que podría ser coincidente con nuestros resultados. Las variaciones en las secuencias identificadas en biopsias de adenocarcinomas colo-rectales y de un paciente control (PD) (Figura 17) sugieren subtipos del VPH18, aunque esto deberá de ser confirmado repitiendo las reacciones de PCR y secuenciación de las muestras que tuvieron productos positivos.

En nuestra experiencia los oligonucleótidos MY no fueron útiles para detectar VPH en muestras de adenocarcinoma colo-rectal. Por otro lado, en nuestra experiencia fue conveniente utilizar dos protocolos diferentes de mezcla para amplificar oligonucleótidos GP, lo cual permitió incrementar la sensibilidad de la técnica. Es probable que si se utilizan otro tipo de oligonucleótidos como el par L1C1 / L1C2 diseñado contra otra región de gen L1 de VPH se podría amplificar VPH en un mayor porcentaje de pacientes infectados.

Aunque no queda duda de la presencia de VPH en porcentajes variables de cáncer colo-rectal, hay que señalar que el método de PCR no permite valorar el sitio exacto de la infección ni el número de copias insertadas en el genoma, lo que hace necesario realizar estudios que permitan precisar esta localización y la cantidad de copias por genoma. ¿Únicamente están infectadas las células circundantes? ¿La infección se encuentra en la lesión precursora? Aunque todo apunta a que el genoma viral está integrado al genoma de la célula tumoral estas aún son preguntas que quedan por responder y para ello es necesario llevar a cabo estudios complementarios que utilicen hibridación in situ, PCR in situ o PCR en tiempo real con micro disección con láser (41). Nosotros nos proponemos continuar el presente estudio en tejido preservado en

parafina e investigar la presencia del VPH en la célula tumoral por medio de Hibridación In Situ en 50 pacientes con adenocarcinoma colo-rectal usando como controles pareados para edad y sexo a pacientes a quienes se le haya hecho colectomía por enfermedad diverticular.

El presente estudio así como los previos, plantean la posibilidad que el VPH sea un factor etiopatogénico para el cáncer colo-rectal y abre la posibilidad de realizar estudios de tamizaje para detección temprana de esta neoplasia así como para su prevención con el uso de vacunas que actualmente ya se utilizan para prevenir el cáncer cérvico-uterino. Sin embargo, en carcinoma cérvico-uterino la lesión se limita a una pequeña área corporal, lo que no sucede en cáncer colo-rectal donde el área es muy extensa, no obstante se ha demostrado que lesiones premalignas, aunque en menor porcentaje, presentan infección por VPH. Esto lo demostró Kirgan en un estudio que demostró infección por VPH en 60% de adenomas colónicos.

CONCLUSIONES

1. La frecuencia encontrada de VPH en tejido crío preservado y fresco de adenocarcinoma colo-rectal fue de un 34.2%, en todos los casos el único tipo observado fue el VPH18.
2. Se identificó VPH 18 en una paciente sin adenocarcinoma colo-rectal que corresponde a un 5.3%.
3. La exposición del residente de oncología médica al laboratorio de investigación básica, le permitió manejar las técnicas moleculares y el razonamiento de los diseños experimentales de la investigación básica y sus aplicaciones al diagnóstico y la prevención.

PERSPECTIVAS

- Debemos repetir la PCR de las muestras positivas para eliminar toda duda de contaminación en las reacciones y corroborar los hallazgos.
- Debemos volver a secuenciar los productos de PCR para descartar o confirmar la presencia de subtipos de VPH 18.
- Debemos extraer ADN de células CsKi que están infectadas con VPH 16 para usarlas como controles positivos.
- Debemos realizar pruebas con tejido de carcinoma cérvico-uterino que sepamos esté infectado con VPH 16 y 18 para usarlas como controles positivos.
- Continuaremos el estudio con Hibridación In Situ en pacientes con cáncer colorectal usando como controles pareados para edad y género a pacientes con colectomía por enfermedad diverticular y a las células HeLa y CsKi cultivadas o que generaron tumores en ratones desnudos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;(55)74-108.
2. Ahmedin Jemal, Rebecca Siegel, Elizabeth Ward, Taylor Murray, Jiaquan Xu, Carol Smigal and Michael J. Thun. Cancer Statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;56;106-130.
3. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) Feb 2007.
4. Pérez LO, Abba MC, Laguens RM and Golijow CD. Analysis of adenocarcinoma of the colon and rectum: detection of Human Papillomavirus DNA by polymerase chain reaction. *Colorectal Disease* 2005(7)492-5.
5. Bodaghi S, Yamanegi K, Xiao HY, DaCosta M, Palefsky JM and Zheng ZM. Colorectal Papillomavirus Infection in Patients with Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research* 2005(11)2862-7.
6. Lee YM, Leu SY, Chiang H, Fung CP, Liu WT. Human Papillomavirus Type 18 in colorectal cancer. *Journal Microbiol Immunol Infect* 2001(34)87-91.
7. Damin DC, Caetano MB, Rosito MA, Schawartsmann G, Damin AS, Frazzon AP, Ruppenthal RD, Alexandre COP. Evidence for an association of human papillomavirus infection and colorectal cancer *European Journal of Surgical Oncology* 2007(33)569-74.
8. Bosch FX, Qiao YL, Catellsagué X. The epidemiology of human papillomavirus infection and its association with cervical cancer. *International Journal Gynecologic Obstetrics* 2006(94)S1.8-21.
9. Guiliani L, Favalli C, Syrjanen K, CiottiM. Human papillomavirus infections in lung cancer. Detection of E6 and E7 transcripts and review of the literature. *Anticancer Res.* 2007(24)2697-04.
10. Tran N, Rose BR, O'Brien CJ. Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. *Head and Neck* 2006(28)64-70.
11. Surveillance Epidemiology and End Results, Cancer Statistics Reviews, 1975-2004. Cancer of the colon and rectum. *National Cancer Institute april* 2005.
12. Tachezy R, Jirasek T, Salakova M, Ludvikova V, Kubecova M, Horak L, Mandys V, Hamsikova E. Human papillomavirus infection and tumours of the anal canal: correlation of histology, PCR detection in paraffin sections and

- serology. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2007(115)195-203.
13. Hausen ZH. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature Reviews Cancer* 2002(2)342-50.
 14. Lowy DM, Howley PM. Papillomaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, et al., Editors. 4th ed. *Fields Virology*, vol2. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2231-64.
 15. Boccardo E, Villa LL. Viral origins of human cancer. *Current Medicinal chemistry*. 2007 (24)2526.39.
 16. Carrillo-Infante C, Abbadessa G, Bagella L, Giordano A. Viral infections as a cause of cancer (review). *International Journal of Oncology* 2007 (30)1521-8.
 17. Suzanne M. Garland, Mauricio Hernandez-Avila, Cosette M Wheeler, Gonzalo Pérez, Diane M Harper, Sepp Leodolter, et al. Quadrivalent Vaccine Against Human Papillomavirus to Prevent Anogenital Diseases. *New England Journal of Medicine* 2007(356)1928-43.
 18. Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Frías-Mendivil M, Solorza G, Lizano M. Utilidad en la combinación de oligonucleótidos universales para la detección del virus del papiloma humano en cáncer cervicouterino y lesiones premalignas. *Salud Pública México* 2004(46)7-15.
 19. Li J, Gerhard DS, Zhang Z, Huettner PC, Wright J, Nguyen L, Lu D, and Arder JS. Denaturing High-Performance Liquid Chromatography for Detecting and Typing Genital Human Papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology* 2003(41)5563-71.
 20. Schulz, T.F. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus-8). *J Gen Virol* 79, 1573-1591.
 21. Rahim Rezaee SA, Cunningham C, Andrew J, Blackburn Davison and David. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus immune modulation: an overview. *Journal of General Virology* 2006(87)1781-1804.
 22. Evans HS, Moller H, Robinson D, Lewis CM, Bell CMJ adn Hodgson SV. The Risk of susequent primary cancers after colorrectal cancer in southeast England. *Gut* 2002(50)647-52.
 23. Chaturvedi AK, Engels EA, Gilbert ES, Chen BE, Store H, Lynch CF, Hall P, Langmark F, Pukkala E, Kaijser M, Andersson M, Fossa SD, Joensuu H, Boice JD, Kleinerman RA, Travis LB. Second Cancers Among 104760 Survivors of

- Cervical Cancer: Evaluation of Long Term Risk. *Journal of The National Cancer Institute* 2007(99)1634-43.
24. Kirgan D, Manalo P, Hall M, McGregor B. Association of human papillomavirus and colon neoplasms. *Archives of Surgery* 1990(125)862-5.
 25. Fuchs CS. A prospective study of family history and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994(331)1669-74
 26. Saqui-Salces M, Martinez Benitez B, Gamboa Martinez A. EBV Lymphoepithelial Carcinoma of the Parotid Gland in Mexican Mestizo Patients with Chronic Autoimmune Disease. *Pathology Oncology Research* 2006(12)41-5.
 27. Akira K. Regulation of Wnt signaling by protein-protein interaction and post-translational modifications. *Experimental and Molecular Medicine* 2006(38)1-10.
 28. Gijls R. Et. Al. The morphogenetic code and colon cancer development. *Cancer Cell* 2007(11)209-17.
 29. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. Garland Science. Fourth edition. 2002. pp:831-900.
 30. Sansom, OJ, Reed K, Hayes A, Ireland H, Brinkmann H, Newton I, Batle E, Simon P, Clevers H, Nathke I, et al. Loss of APC in vivo immediately perturbs Wnt signalling differentiation, and migration. *Genes Development* 2004(18)1385-90.
 31. White EG. El ministerio de curación. 1905, pp: 241.
 32. Harkins L, Volk AL, Minu S, Mikolaenko I, Brito WJ, Bland KI, Cobbs CS. Specific localisation of human cytomegalovirus nucleic acids and proteins in human colorectal cancer. *The Lancet* 2002(360)1557-63.
 33. Psyrrri A, DiMaio D. Human Papillomavirus in cervical and head and neck cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2008(5)24-31 .
 34. Tae J, Chang JK, Suk KW, Tae SK, Dong JJ, Myung SK, Sunwoo L, Hyun SC, Sungwhan A. Development and clinical evaluation of highly sensitive DNA microarray for detection and genotyping of human papillomaviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 2004(42)3272-80.
 35. Heideman DAM, Waterboer T, Pawlita M, Diemen PD, Nindl I, Leijte JA, Bonfrer JMG, Horenblas S, Meijer C, Snijders P. Human Papillomavirus-16 is

- the predominant type etiologically involved in penile squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Oncology* 2007(25)4550-7.
36. McLaughlin DME, Munger K. Virus associated with human cancer (review). *Biochimica et Biophysica Acta* 2008(1782)127-50.
 37. Gatenby RA, Vincent TL. An evolutionary model of carcinogenesis. *Cancer Research* 2003(63)6212-20.
 38. Korschineck I, Ziegler S, Breuss J, Lang I, Lorenz M, Kaunt C, Ambros PF, Binder BR. Identification of novel exon in apolipoprotein E Receptor 2 leading to alternatively spliced mRNAs found in cells of the vascular wall but not in neuronal tissue. *The Journal of Biological Chemistry* 2001(276)1392-7.
 39. De Vita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA. De Vita H & R. Cancer: Principles & Practice of Oncology. 8th. Edition. 2008. Lippincott Williams & Wilkins.
 40. Lizano M, De la Cruz E, Carrillo A, García A, Ponce de Leon S, Dueñas A, Hernández DM, Mohar A. Distribution of HPV16 and 18 intratypic variants in normal cytology, intraepithelial lesions, and cervical cancer in a Mexican population. *Gynecologic Oncology*. 2006(102)230-5.
 41. Darby I. In Situ Hybridization Protocols. Methods in Molecular Biology. Totowa New Jersey. 2nd edition. 2000. Human Press.
 42. Li CM, Clark ME, Chimeto MF, Curcio CA. Apolipoprotein localization in isolated drusen and retinal apolipoprotein gene expression. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 2006(47)3119-28.