UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA

ANALISIS MOLECULAR DE LOS FACTORES EXTRINSECOS E INTRINSECOS ASOCIADOS A CANCER CERVICO-UTERINO

POR:

Q.C.B., M.C. SANDRA GUADALUPE MARTINEZ G.

Como requisito para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Diciembre, 2002

TD
RC280
.U8
M3
c.1

Q.C.B., M.C. SANDRA GUADALUPE MARTINEZ G.

1080116991

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

ANALISIS MOLECULAR DE LOS FACTORES EXTRINSECOS E INTRINSECOS ASOCIADOS A CANCER CERVICO-UTERINO

POR:

Q.C.B., M.C. SANDRA GUADALUPE MARTINEZ G.

Como requisito para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en
Biología Molecular e Ingeniería Genética

Diciembre, 2002

UANL
FONDO
TESIS DOCTORADO

RTC280
.U8
M3

BU Raúl Rangel Frías
UANL
FONDO
TESIS DOCTORADO

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Rocío Ortíz López y la coasesoría del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña.

ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS ASOCIADOS A CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

Aprobación de la Tesis:

DRA ROCIO ORTIZ LOPEZ
Director de Tesis

DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis

DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Comisión de Tesis

DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Comisión de Tesis

DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Comisión de Tesis

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

AGRADECIMIENTOS

A todas las **"PACIENTES"** que aceptaron participar en el estudio y contribuyeron para el desarrollo de esta tesis.

A las personas que de una u otra manera colaboraron para hacer posible la realización de esta tesis, en orden alfabético:
Dra. Oralia Barbosa Quintana
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña
Dr. Ricardo M. Cerda Flores
Dr. Iván Delgado Enciso
Dr. Juan P. Flores Gutiérrez
Dr. José G. Garza Leal
Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez
Dra. Rocío Ortíz López
Dra. Agnès Revol de Mendoza
Dr. Augusto Rojas Martínez
Dr. Oscar Vidal Gutiérrez

A todos los integrantes del Departamento de Ginecología y Obstetricia y del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario "José E. González", de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo al proyecto y por la beca que me otorgó.

A mis **"AMIGOS"** por darme su amistad y colaboración durante mis años de estancia en la U.L.I.E.G.

A mis **"NUEVOS AMIGOS"** que me han aceptado y me han ayudado a salir adelante en la nueva etapa de mi vida.

Al **Dr. Antonio M. Gutiérrez Gutiérrez** por confiar en mi.

A **Claudia, Victor y Andy** por aceptarme como de su familia.

A **mi "FAMILIA" (Mamá, Papá, Gordo y Miriam)** por acompañarme y apoyarme siempre en todo momento.

A **Julián** por darme la oportunidad de conocerlo.

A **Dios** por estar siempre a mi lado.

RESUMEN

Facultad de Medicina de la U.A.N.L.
Q.C.B., M.C. Sandra Gpe. Martínez Garza

Título del Estudio: ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS ASOCIADOS A CÁNCER CÉRVICO-UTERINO.

Candidata para el grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética.
Área de Estudio: Medicina Molecular.

Objetivo y Método de Estudio: Dentro de las enfermedades neoplásicas, el Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU), es uno de los problemas prioritarios en salud pública del mundo. En los países latinoamericanos y en particular en México, el problema es aún más acentuado, pues es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres con una tasa de mortalidad de 15/100,000 habitantes, lo que ubica a México como uno de los países con más alta tasa de mortalidad por esta causa en el mundo. El virus del papiloma humano (HPV), considerado como un factor extrínseco, ha sido asociado al CaCU como una causa necesaria, aunque no suficiente para el desarrollo de la enfermedad. Entre las evidencias que indican que algunos HPV están involucrados tenemos: 1) El DNA viral se encuentra en >90% de dichos tumores (más frecuentemente el DNA del HPV tipo 16), 2) El DNA del HPV se integra al genoma celular, 3) Los oncogenes de los HPVs de alto riesgo inmortalizan cultivos primarios de queratinocitos humanos con la cooperación del oncogen ras, 4) El aumento de la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7. Mientras que entre los factores intrínsecos de las pacientes cuya función es mediar la infección del virus, destacan: haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), la predisposición genética a CaCU conferida por el polimorfismo en el codón 72 en la proteína tumor-supresora p53 y las mutaciones en los oncogenes Ras. Considerando que el CaCU es debido a diversos factores, el objetivo de este estudio fue determinar la posible asociación de CaCU con: 1) Factores extrínsecos (tipos de HPVs, integración del HPV 16 y número de copias del HPV 16), 2) Factores intrínsecos (HLA, polimorfismo en el gen p53 y mutaciones en los oncogenes K y H-ras) en mujeres con y sin CaCU. La investigación incluyó un aspecto de tipo clínico y uno experimental. En el primero se obtuvo la información clínico-patológica de 185 pacientes (85 casos y 100 controles) en una entrevista con los pacientes, aplicación de un cuestionario y análisis del estudio de patología. La parte experimental incluyó: 1) El establecimiento de un banco de DNA a partir de muestras de tejido fresco y sangre, 2) Implementación de las técnicas para la detección de 27 tipos de HPV, 3) Implementación de las técnicas para conocer el estado de integración y el número de copias de HPV 16, 4) Determinación de los alelos DQA, 5) Implementación de las técnicas para determinar los alelos DQB, DR3, DR4 y el polimorfismo en el codón 72 del gen p53, 5) Determinación de las mutaciones presentes en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras y el codón 12 del oncogen H-ras y 6) Asociación de los datos clínico-patológicos con cada uno de los

factores analizados en las mujeres con CaCU vs mujeres sin CaCU. **Contribuciones y Conclusiones:** Nuestros resultados confirman una alta asociación entre HPV y CaCU. Sin embargo no encontramos asociación entre el estado de integración y el número de copias de HPV 16 y CaCU. Observamos que en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad, el alelo DQB*0602 y el haplotipo DQA-DQB*4-*0602 actúan como factores protectores mientras que el alelo DQB*0201 actúa como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en la población mexicana. El polimorfismo Arg/Arg previamente relacionado con CaCU en otras poblaciones, no mostró diferencia significativa entre ambos grupos. Sin embargo, en nuestra población el polimorfismo Pro/Pro del codón 72 del gen p53 es un factor de riesgo en las pacientes HPV-16 positivas de padecer CaCU de células escamosas. En cuanto a los oncogenes ras los cuales han sido asociados a diferentes cánceres, en nuestro estudio, la frecuencia de mutaciones en el codón 12 del oncogen H-ras en CaCU es de 12% y del oncogen K-ras es de 3.5%. La información encontrada en este estudio aporta datos importantes a la epidemiología molecular del CaCU en nuestro país, además de que los factores intrínsecos: 1) alelo DQB*0201, 2) alelo DQB*0602, 3) haplotipo DQA-DQB*4-*602 y 4) el polimorfismo Pro/Pro del codón 72 del gen p53, pudieran ser utilizados como marcadores moleculares predictivos para el desarrollo de la enfermedad.

FIRMA DEL ASESOR:

Dra. Rocío Ortíz López

FIRMA DEL CO-ASESOR:

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

LISTA DE TABLAS

		Página
1.	Historia natural de las neoplasias intraepiteliales cervicales.	8
2.	Genes del HPV.	11
3.	Tipos de HPVs identificados por el estuche.	38
4.	Condiciones de amplificación para la detección de HPVs.	39
5.	Condiciones del programa para la amplificación de HPVs.	39
6.	Condiciones de reacción para la amplificación del gen E1 de HPV-16.	43
7.	Condiciones de reacción para la amplificación del gen E2 de HPV-16.	43
8.	Condiciones del programa para la amplificación del gen E2 de HPV-16.	44
9.	Condiciones de la reacción para la amplificación del gen E6 de HPV-16.	45
10.	Condiciones del programa para la amplificación del gen E6 de HPV-16.	46
11.	Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DQA.	48
12.	Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DQA.	48
13.	Secuencia de primers usados para determinar los alelos HLA-DQB.	50
14.	Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DQB.	51
15.	Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DQB.	51
16.	PCRs utilizadas para la identificación de los alelos HLA-DQB.	52
17.	Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DR3.	54
18.	Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DR3.	54
19.	Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DR4.	55
20.	Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DR4.	55
21.	Condiciones de reacción para la amplificación del codón 72 de p53.	57
22.	Condiciones del programa para la amplificación del codón 72 de p53.	57
23.	Mezcla para preparar los geles de poliacrilamida al 12%.	58

24. Condiciones de reacción para la amplificación de los codones 12 y 13 de K-ras. 59
25. Condiciones del programa para la amplificación de los codones 12 y 13 de K-ras. 60
26. Condiciones de reacción para la amplificación del codón 12 de H-ras. 62
27. Condiciones del programa para la amplificación del codón 12 de H-ras. 62
28. Grado de diferenciación de los CaCU. 64
29. Grado de invasión de los CaCU. 65
30. Características de la población. 65
31. Antecedentes de la población. 66
32. Frecuencia de tipos de HPVs. 69
33. Frecuencia de HPV de acuerdo al estadio del CaCU. 70
34. Frecuencia de integración y grado de invasión. 72
35. No. de copias de HPV-16 de acuerdo al grado de invasión. 75
36. Frecuencia de alelos de DQA. 77
37. Frecuencia de genotipos de DQA. 77
38. Frecuencia de los alelos DQB. 79
39. Frecuencia de genotipos DQB. 80
40. Frecuencia de los haplotipos DQA-DQB. 81
41. Frecuencia de los alelos DR3 y DR4. 83
42. Frecuencia de genotipos de p53. 84
43. Distribución de los genotipos de acuerdo al diagnóstico histopatológico. 85

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Esquema de la zona de transformación del cérvix.	4
2. Estadios del CaCU.	5
3. Patogénesis multifactorial del condiloma y la neoplasia cervical.	8
4. Puntos clave del ciclo celular en células de mamíferos.	10
5. Marcos de lectura del HPV tipo 16.	12
6. Mapa molecular del MHC humano.	17
7. Estrategia General (primera parte).	26
8. Estrategia General (segunda parte).	27
9. Estrategia para la detección de HPV.	37
10. Esquema de una hibridación reversa.	38
11. Diagrama de detección de la integración del HPV.	42
12. Análisis de DNAs en geles de agarosa al 1%.	67
13. Amplificación y Tipificación de HPVs.	68
14. Amplificación de los genes E1 y E2 del HPV 16.	71
15. Integración de acuerdo al estadio del CaCU.	72
16. Amplificación del gen E6 y curva de calibración para cuantificar el número de copias de HPV-16.	73
17. Gráfico de frecuencia del número de copias virales/100 ng de DNA genómico vs tipo de cáncer.	74
18. Tipificación con el estuche del marcador HLA-DQA.	76
19. Amplificación de los alelos DQB.	78
20. Amplificación de los alelos DR3 y DR4.	82
21. Amplificación de los alelos Arginina/Prolina en el codón 72 del gen p53.	84
22. Detección de mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras.	86
23. Detección de mutaciones en el codón 12 del oncogen H-ras.	86

NOMENCLATURA

A	Homocigoto para arginina
AO	Anticonceptivos orales
A/P	Heterocigoto para arginina/prolina
Arg	Arginina
Ca	Cáncer
CaCU	Cáncer Cérvico-Uterino
Cel	Células
cm	Centímetros
cols.	Colaboradores
CS	Compañeros sexuales
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Trifosfato de desoxiribonucleósidos
DS	Desviación estándar
EUA	Estados Unidos de América
FIGO	Federation Internationale de Gynecologie et d´Obstétrique
FQ	Fibrosis cística
HCl	Ácido clorhídrico
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HSIL	Lesiones intraepiteliales escamosas de alto riesgo
HPV	Papilomavirus humanos
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Intervalos de confianza
IVSA	Inicio de la vida sexual activa
Kb	Kilobases
LCR	Región controladora del locus
LSIL	Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo riesgo
LT	Linfotoxina
M	Marcador de peso molecular

$MgCl_2$	Cloruro de magnesio
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Concentración milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración micromolar
N	Total de muestras
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos
NIC	Neoplasias intraepiteliales cervicales
No. y #	Número
NS	No significativa
Oligos	Oligonucleótidos
OMS	Organización mundial de la salud
Pa	Pacientes
P	Homocigoto para prolina
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	-log [H+]
Pro	Prolina
RFLPs	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SA-HRP	Estrepto vidina-peroxidasa de rábano
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
STD	Estándar
Taq	DNA polimerasa de *Thermus aquaticus*

TEMED	N, N, N´, N´-*tetrametilendiamina*
TMB	Tetrametilbencidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
U	Unidades
U.A.N.L.	Universidad Autónoma de Nuevo León
ULIEG	Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas
V	*Volts*
Vol.	Volumen
vs	Versus
VSAN	*Vida sexual activa negada*
X	Veces la concentración
Zona T	Zona de transformación
[Final]	*Concentración final*
-	Control negativo
+	Control positivo
°C	Grados centígrados
>	Mayor que
<	Menor que
%	Porciento

TABLA DE CONTENIDO

	Página
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 CÁNCER	1
1.2 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO, un importante problema de salud	3
1.3 HISTOPATOLOGÍA DEL CaCU	3
1.4 FACTORES RELACIONADOS AL CaCU	6
1.4.1 FACTORES EXTRÍNSECOS ASOCIADOS AL CaCU	7
1.4.1.1 HPV como causa del CaCU	9
1.4.1.1A Virus del Papiloma Humano (HPV)	10
1.4.1.1B Epidemiología del HPV	12
1.4.1.2 Integración del HPV	13
1.4.1.3 *Número de copias del* HPV	14
1.4.2 FACTORES INTRÍNSECOS ASOCIADOS AL CaCU	14
1.4.2.1 Complejo mayor de histocompatibilidad	15
1.4.2.2 Polimorfismo de p53	18
1.4.2.3 Mutaciones en los genes RAS	19
II JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
2.1 JUSTIFICACIÓN	21
2.2 OBJETIVOS	22
2.2.1 OBJETIVO GENERAL	22
2.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	22
III ESTRATEGIA GENERAL	24

IV MATERIALES Y MÉTODOS 28
4.1 MATERIALES 28
4.1.1 ÁREA DE TRABAJO 28
4.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO 28
4.1.3 REACTIVOS QUÍMICOS 29
4.1.4 MATERIAL DE LABORATORIO 30
4.1.5 EQUIPO DE LABORATORIO 31
4.1.6 APOYO COMPUTACIONAL 31
4.2 MÉTODOS 32
4.2.1 TIPO DE ESTUDIO 32
4.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LAS PACIENTES 32
4.2.3 MUESTRAS DE CASOS Y CONTROLES 33
4.2.4 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO 33
4.2.4.1Extracción de DNA genómico a partir de muestras de sangre 33
4.2.4.2 Extracción de DNA genómico a partir de las biopsias de cérvix 34
4.2.4.3 Evaluación de la calidad y la concentración de DNA 35
4.2.5 ANÁLISIS DE FACTORES EXTRÍNSECOS (HPV) 36
4.2.5.1 Detección de 27 tipos de HPV 36
4.2.5.1A Amplificación del HPV 38
4.2.5.1B Verificación de los productos amplificados 40
4.2.5.1C Hibridación y detección de los HPVs 40
4.2.5.2 Determinación de la integración del HPV tipo 16 41
4.2.5.2A Amplificación del gen E1 y E2 42
4.2.5.2B Verificación de los productos ampliticados 44
4.2.5.3 Determinación del número de copias virales del HPV tipo 16 44
4.2.5.3A Amplificación del gen E6 para determinar el número de copias 45
4.2.5.3B Verificación de los productos amplificados 46
4.2.5.3C Semicuantificación del no. de copias de HPV 16 46
4.2.6 ANÁLISIS DE FACTORES INTRÍNSECOS (HLA, p53 Y ONCOGENES RAS) 47

4.2.6.1 Determinación de los alelos HLA-DQA 47
4.2.6.1A Amplificación de HLA-DQA 47
4.2.6.1B Verificación de los productos amplificados 48
4.2.6.1C Tipificación de los alelos HLA-DQA por hibridación reversa en mancha 48
4.2.6.2 Determinación de los alelos HLA-DQB 49
4.2.6.2A Amplificación de HLA-DQB 51
4.2.6.2B Verificación de los productos amplificados 52
4.2.6.2C Identificación de los alelos HLA-DQB 52
4.2.6.3 Determinación de los alelos HLA-DR3 y HLA-DR4 53
4.2.6.3A Amplificación de HLA-DR3 y HLA-DR4 54
4.2.6.3B Verificación de los productos amplificados 55
4.2.6.4 Identificación del polimorfismo de p53 56
4.2.6.4A Amplificación del polimorfismo de p53 56
4.2.6.4B Verificación de los productos amplificados 57
4.2.6.5 Detección de mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras 58
4.2.6.5A Amplificación de los codones 12 y 13 de K-ras 59
4.2.6.5B Verificación de los productos amplificados 60
4.2.6.5C Digestión con enzimas de restricción 60
4.2.6.5D Resolución de los productos de digestión 61
4.2.6.6 Detección de mutaciones en el codón 12 de H-ras 61
4.2.6.6A Amplificación del codón 12 de H-ras 61
4.2.6.6B Verificación de los productos amplificados 62
4.2.6.6C Digestión con enzimas de restricción 63
4.2.6.6D Resolución de los productos de digestión 63
4.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO 63

V *RESULTADOS* 64
5.1 DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS 64
5.2 DATOS DE GENÉTICA MOLECULAR 66

5.2.1 BANCO DE DNA GENÓMICO 66
5.2.2 FACTORES EXTRÍNSECOS 68
5.2.2.1 Detección y tipificación de HPVs 68
5.2.2.1A Amplificación y tipificación de HPVs 68
5.2.2.1B Frecuencias de HPVs 69
5.2.2.2 Integración del HPV 16 70
5.2.2.2A Amplificación y verificación de los productos amplificados de los genes E1 y E2 70
5.2.2.2B Frecuencia de integración 71
5.2.2.3 Número de copias del HPV 16 73
5.2.2.3A Amplificación y verificación del producto amplificado del gen E6 del HPV 16 73
5.2.2.3B Asociación del número de copias virales y características de los CaCU 74
5.2.3 FACTORES INTRÍNSECOS 75
5.2.3.1 Determinación de los alelos DQA 75
5.2.3.1A Detección y tipificación de los alelos DQA 75
5.2.3.1B Frecuencia de los alelos DQA 76
5.2.3.2 Determinación de los alelos DQB 78
5.2.3.2A Detección e identificación de los alelos DQB 78
5.2.3.2B Frecuencia de los alelos DQB 79
5.2.3.3 Determinación de los alelos DR3 y DR4 82
5.2.3.3A Detección de los alelos DR3 y DR4 82
5.2.3.3B Frecuencia de los alelos DR3 y DR4 83
5.2.3.4 Determinación del polimorfismo en el codón 72 del gen p53 83
5.2.3.4A Detección del polimorfismo en el codón 72 del gen p53 83
5.2.3.4B Frecuencia del polimorfismo en el codón 72 del gen p53 84
5.2.3.5 Determinación de las mutaciones presentes en Ras 85
5.2.3.5A Detección de las mutaciones en los oncogenes K- y H-ras 85
5.2.3.5B Frecuencia de mutaciones en los oncogenes Ras 87

VI DISCUSIÓN 88

VII CONCLUSIONES 96

VIII PERSPECTIVAS 98

• **REFERENCIAS** 99

• **ANEXO I**
Cuestionario
Carta de consentimiento informado
• **ANEXO II**
Contribuciones científicas