CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

El cáncer es la segunda causa más común de muerte en México y EUA, después de las enfermedades cardiovasculares. Según el Registro Histopatológico de Neoplasias en México en 1997, las cinco neoplasias más frecuentes fueron cérvico- uterino (22.9%), mama femenina (10.3%), glándula prostática (6%), ganglios linfáticos (4.7%) y estómago (4.2%)[1]. El cáncer afecta a individuos de todas las edades y a una extensa variedad de órganos. La frecuencia de muchos de los cánceres aumenta con la edad, de modo que conforme el promedio de vida de los seres humanos se incrementa y la calidad de vida de éstos mejora, un número mayor desarrollará la enfermedad[2].

El cáncer es caracterizado por una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede al tejido normal, que no está coordinado con él, y que puede llevar a una invasión de tejido local y metástasis sistémicas[3]. Recientemente, el cáncer ha sido considerado como una enfermedad genética, clasificándose como desorden somático acumulativo, al lado de los desórdenes mendelianos, las cromosomopatías, los desórdenes mitocondriales, las enfermedades monogénicas y las multifactoriales[4].

Ahora se sabe que un proceso neoplásico resulta de una serie de alteraciones genéticas, producto de la acumulación de mutaciones a lo largo del tiempo,

tanto en genes que activan la división celular, como en otros que vigilan y ordenan eliminar células potencialmente cancerosas (proto-oncogenes, genes supresores de tumor y genes involucrados en la activación de la transcripción del ciclo celular y la apoptosis), interrumpiendo el mecanismo normal que controla la proliferación celular[5]. En la mayoría de los casos, las mutaciones ocurren después del evento de fecundación en una célula en particular, y están restringidas a las células hijas que se derivan (clonas) de ésta. Esta clona acumula mutaciones en su material genético y durante el transcurso del tiempo da origen a un tumor maligno[6].

En varios cánceres humanos se ha demostrado que mutaciones específicas en algunos genes están relacionadas con estados histopatológicos del desarrollo y progresión del tumor. Por lo tanto, el daño genético (mutación) representa un marcador potencialmente valioso en la detección y evaluación de la neoplasia, siendo muy variados e incluyendo cualquiera de las siguientes formas:

1. Amplificación de una región del cromosoma.
2. Deleciones ó pérdidas de material genético.
3. Translocaciones o rearreglos cromosómicos.
4. Mutaciones puntuales que implican la sustitución de un aminoácido (mutación de sentido equivocado) o la terminación prematura de la traducción (proteína truncada).
5. Inserción de DNA exógeno, generalmente ocurrida por la inserción de material genético viral.
6. Expansión de secuencias repetitivas de nucleótidos debidas a deslizamientos de la polimerasa en el proceso de duplicación de DNA o por defectos en los mecanismos de reparación del mismo.

1.2 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO, un importante problema de salud

Dentro de las enfermedades neoplásicas, el cáncer cérvico-uterino (CaCU) es uno de los problemas prioritarios de salud pública del mundo. Ocupa la segunda causa de muerte por neoplasias en la población femenina a nivel global, siendo sólo superada por el cáncer de mama. En los países latinoamericanos y en particular en México, el problema es aún más acentuado, pues es la segunda causa de muerte por cáncer a nivel general y la primera en la población femenina. De 1993 a 1997, 62,289 mujeres murieron de CaCU (28.1% de mortalidad debido a cáncer), dando una mortalidad de 15/100,000 habitantes. En 1997, se registraron 20,008 casos nuevos (22.9% de la incidencia total de cáncer), lo que ubica a México como uno de los países con la más alta tasa de mortalidad por esta causa en el mundo[1,7,8].

A pesar de los extensos programas de detección temprana de CaCU mediante citología exfoliativa, que han reducido globalmente la mortalidad en más de un 70%[9], por diversas razones éstos no han presentado el mismo impacto en todas las poblaciones y se estima que las fallas de detección temprana son responsables hasta de un 60% de la mortalidad por esta neoplasia[10]. Por lo antes mencionado, el diseñar nuevas estrategias que permitan la detección temprana de esta patología, o aún mejor, que lleven a identificar a las mujeres en riesgo de desarrollar CaCU antes de presentarlo, representa una de las alternativas para combatir este tipo de cáncer.

1.3 HISTOPATOLOGÍA DEL CaCU

El cérvix incluye tanto la porción vaginal (ectocervical) y la interna (endocervical). El ectocérvix está cubierto por epitelio escamoso estratificado y

está delimitado del endocérvix por epitelio columnar mucinoso que se invagina por debajo del estroma formando estructuras como glándulas. La mayoría de los cánceres cervicales son de tipo escamoso y generalmente se generan de la zona de transformación, la cual es una región específica del cérvix. Esta zona es una área en lo cual se lleva a cabo un proceso llamado metaplasia escamosa, durante el cual el que el epitelio columnar localizado en la zona de unión entre el ecto y endocérvix es reemplazado por epitelio escamoso (figura 1). Con menos frecuencia ocurren los carcinomas cervicales provenientes del epitelio columnar/glandular del endocérvix (adenocarcinomas)[11].

Figura 1. Esquema de la zona de transformación del cérvix. Se observa la zona de transformación, lugar donde se lleva a cabo la metaplasia escamosa (transformación del epitelio columnar a escamoso) en las diferentes etapas de la vida desde el nacimiento hasta después de la menopausia. Modificado a partir de Tenorio-González F[12].

Durante el desarrollo de los carcinomas escamosos, las células escamosas metaplásicas presentes en la zona de transformación llevan a cabo cambios morfológicos distintos, que acompañan la transición del epitelio normal a carcinoma (figura 2). Las lesiones confinadas al epitelio son clasificadas como lesiones intraepiteliales escamosas de bajo riesgo (LSIL) o de alto riesgo (HSIL), dependiendo de sus características morfológicas. Las lesiones

intraepiteliales son caracterizadas por cambios anormales histopatológicamente en la proliferación y diferenciación celular.

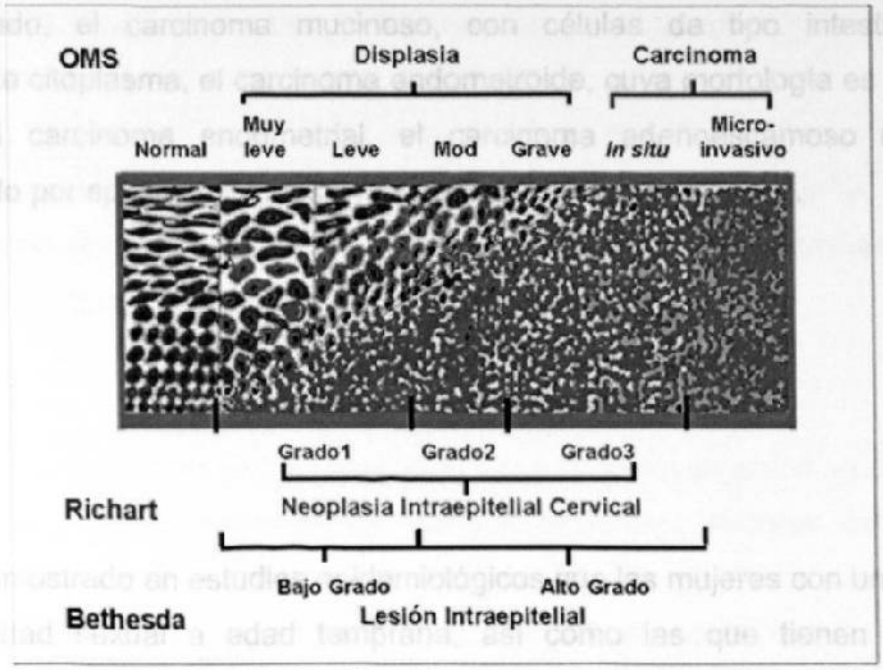

Figura 2. Estadios del CaCU. Clasificación de las etapas premalignas del CaCU y de carcinoma, según los criterios de la OMS, Richart y el Sistema Bethesda. Modificado a partir de Krebs HB[19].

El carcinoma escamoso del exocérvix es el más frecuente, entre 75 a 80%. Según la morfología celular, se clasifican como de células grandes no queratinizantes, de células grandes queratinizantes y de células pequeñas no queratinizantes. Esta subclasificación tiene implicaciones pronósticas: en los tumores con células grandes queratinizantes la sobrevida es de 68.5%, con células grandes queratinizantes es de 41.7% y con células pequeñas no queratinizantes es de 20%[12].

El adenocarcinoma se origina en el endocérvix. Los informes acerca de su frecuencia son muy variables (de 10 hasta el 34%). Hay varios patrones

histológicos con su particular significancia pronóstica. El tipo endocervical es el más frecuente (hasta un 90%) y su morfología es parecida a las células de las criptas endocervicales, el adenocarcinoma de desviación mínima (antes llamado adenoma maligno) con patrón de crecimiento glandular bien diferenciado, el carcinoma mucinoso, con células de tipo intestinal con abundante citoplasma, el carcinoma endometroide, cuya morfología es parecida a la del carcinoma endometrial, el carcinoma adenoescamoso o mixto, constituido por epitelio escamoso y glandular (ambos malignos)[12].

1.4 FACTORES RELACIONADOS AL CaCU

Se ha demostrado en estudios epidemiológicos que las mujeres con un inicio de su actividad sexual a edad temprana, así como las que tienen múltiples compañeros sexuales, están en un riesgo mayor de padecer este cáncer, aunque no se conoce como es que estos factores afectan, ni como ciertas características sexuales específicas afectan el riesgo, pero se cree que en edades tempranas existe un incremento de la susceptibilidad del cérvix, debido a la metaplasia pavimentosa que está ocurriendo[13].

Existen otros factores de riesgo asociados, como son: 1) los patrones demográficos: el CaCU es más frecuente en Latinoamérica y mujeres de clase socioeconómica baja presentan el mayor riesgo, mientras que mujeres judías de Israel el menor riesgo; 2) las deficiencias nutricionales, principalmente de vitamina A, C, D, β-carotenos y folatos; 3) hábito de fumar, pues se han encontrado sustancias carcinogénicas derivadas del cigarro en biopsias de cérvix; 4) el uso de anticonceptivos orales; 5) la paridad; etc[13].

También se ha determinado el papel del comportamiento sexual masculino como un factor determinante en el riesgo para CaCU: 1) existe un incremento de cáncer de cérvix y de pene en ciertas áreas geográficas; 2) las esposas de hombres con cáncer de pene tienen de 3 a 6 veces mayor riesgo de padecer CaCU que las mujeres control; 3) las mujeres casadas con hombres quienes sus primeras esposas presentaron CaCU tienen un riesgo doble de padecer CaCU; 4) mujeres quienes sus parejas tienen de 10 a más compañeras sexuales presentan un riesgo de 5 a 7 veces mayor que las mujeres control[13], [14], [15]. Todos estos factores han sido relacionados, aunque sin embargo no se les ha demostrado asociación causativa con el CaCU.

Los factores que si han sido asociados al CaCU por investigación se dividen en dos grandes grupos dependientes de las pacientes: factores extrínsecos, aquellos en los cuales no *intervienen los antecedentes genéticos y los factores* intrínsecos, los cuales son dados por los antecedentes genéticos de cada una de las mujeres.

1.4.1 FACTORES EXTRÍNSECOS ASOCIADOS AL CaCU

Se ha podido determinar que la intervención de los papilomavirus humanos (HPV) oncogénicos o de alto riesgo, (tipo 16, 18, 31 y 45) está relacionada con más del 90% de todos los casos de CaCU[9]. Las infecciones por HPVs son resueltas por el huésped en un 30-60% si son displasias, aunque no se logra la eliminación del virus; pero un pequeño porcentaje (1%) de mujeres con infección crónica no resuelta, ésta evoluciona a CaCU invasor (tabla 1 y figura 3)[16], [17], [18], [19], [20], [21].

Tabla 1. Historia Natural de las Neoplasias Intraepiteliales Cervicales

Lesión (%)	Regresión (%)	Persistencia (%)	Progresión a cáncer *in situ* (%)	Progresión a cáncer invasor (%)
NIC I	57	32	11	1
NIC II	43	35	22	5
NIC III	32	<56	-	<12
NIC I-HPV	56	27	15	0
NIC II-HPV	53	23	21	0
NIC III-HPV	14	15	69	?

Modificado a partir de Disaia PS[20].

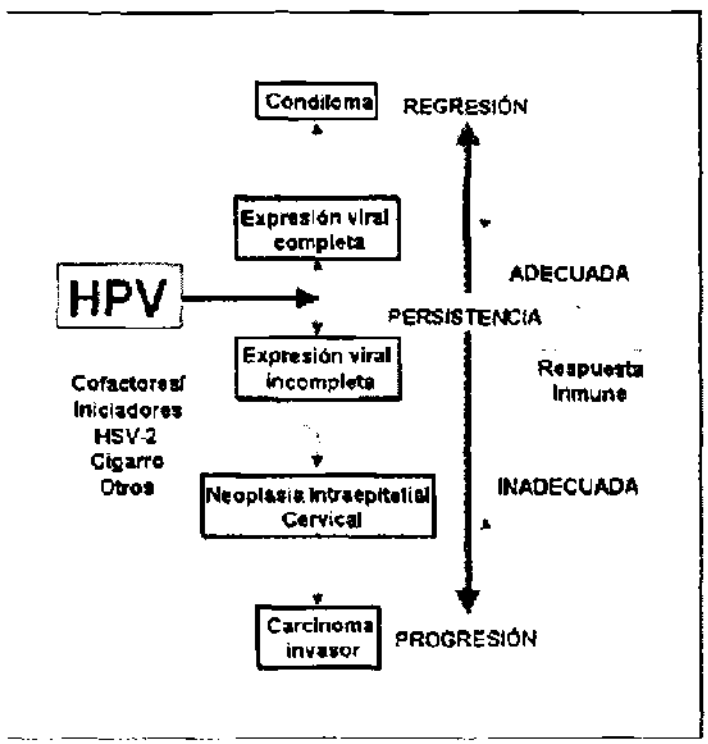

Figura 3. Patogénesis multifactorial del condiloma y la neoplasia cervical. La expresión y replicación viral completa en las células escamosas cervicales se manifiestan por la proliferación, maduración y formación de condilomas ordinarios. La expresión viral incompleta resulta en la proliferación de células inmaduras donde se potencia la integración del virus en los cromosomas del huésped. En éstas se produce la expansión clonal y transformación del epitelio, hasta evolucionar a una enfermedad neoplásica invasiva. La persistencia y progresión neoplásica son facilitadas muy probablemente por una disminución de la vigilancia del sistema inmune. Modificado a partir de González de León C[21].

1.4.1.1 HPV como causa del CaCU

Entre las evidencias causales que indican que algunos HPVs están involucrados en CaCU, se sabe que:

1) El DNA viral se encuentra en más del 90% de dichos tumores (más frecuentemente el DNA del HPV tipo 16)[9];

2) En los tumores, el DNA del HPV se integra al genoma celular, rompiendo e inactivando el gen E2. Esto favorece la expresión de los oncogenes virales E6 y E7[22];

3) Los oncogenes de HPV de alto riesgo son capaces de inmortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos, pero necesitan la cooperación del oncogen ras para transformarlos. Además, al cultivar durante tiempos largos las células inmortalizadas por E6 y E7, éstas dan origen a clonas malignas, lo que sugiere que un gen celular se modifica en dichos cultivos[22];

4) Las oncoproteínas virales E6 y E7 destruyen la actividad de las proteínas antioncogénicas (supresoras de tumores) p53 y pRb, respectivamente[23], [24]. Estas últimas dos proteínas están implicadas en funciones importantes del control del ciclo celular y su inactivación conduciría a la transformación maligna en CaCU (figura 4) [25].

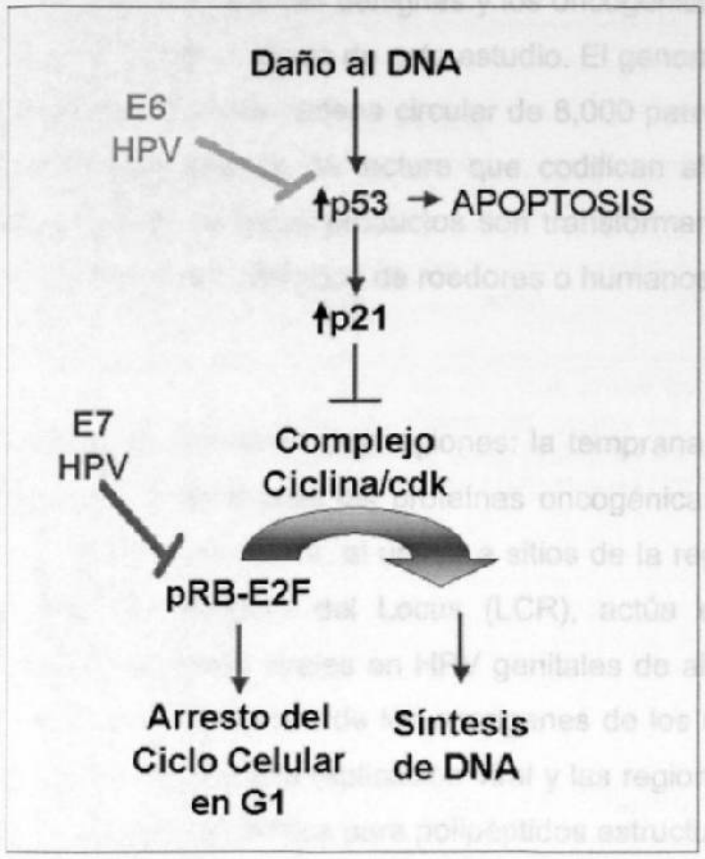

Figura 4. Puntos clave del ciclo celular en células de mamíferos. Al dañarse el DNA se produce acumulación de la proteína p53. Esta acumulación incrementa a su vez los niveles de la proteína p21, la cual inhibe la activación del complejo ciclina/cdk y previene la fosforilación de pRB. Los factores de transcripción E2F permanecen asociados a pRB-hipofosforilado y son incapaces de activar la transcripción de los genes requeridos para la progresión de G1 a la fase S. Consecuentemente el ciclo celular se detiene en G1. Los HPVs de alto riesgo pueden romper el ciclo celular en dos puntos separados: a través de la interacción de E6 con p53 y de E7 con pRB, además de inducir la muerte celular por apoptosis debida al daño celular. Modificado a partir de Vogelstein B[18].

1.4.1.1A Virus del Papiloma Humano (HPV)

Los papilomavirus son un grupo de virus epiteliotróficos que como su nombre lo indica causan proliferaciones en el epitelio y se han relacionado con cáncer en animales y humanos. Se han encontrado más de 60 genotipos de papilomavirus patógenos humanos que se dividen en dos grandes grupos: no oncogénicos

(bajo riesgo), involucrados en lesiones benignas y los oncogénicos (alto riesgo), como los implicados en el tumor objeto de este estudio. El genoma de los HPVs es una molécula de DNA de doble cadena circular de 8,000 pares de bases, en la cual existen numerosos marcos de lectura que codifican alrededor de 10 productos génicos. Algunos de estos productos son transformantes cuando se introducen en cultivos celulares primarios de roedores o humanos[26].

Los marcos de lectura se dividen en dos regiones: la temprana (E) y la tardía (L). La región temprana codifica para las proteínas oncogénicas E6 y E7, así como para la proteína E2. Esta última, al unirse a sitios de la región promotora viral llamada Región Controladora del Locus (LCR), actúa como inhibidor transcripcional de los oncogenes virales en HPV genitales de alto riesgo. Esta misma proteína activa la transcripción de los oncogenes de los HPV cutáneos. En la LCR se encuentra el origen de replicación viral y las regiones promotoras de estos virus. La región tardía codifica para polipéptidos estructurales del virión (tabla 2, figura 5)[22], [26], [27].

Tabla 2. Genes del HPV

Genes	Función principal
E6	Transformación celular, unión con p53, degradación
E7	Transformación celular, unión con Rb, activación de la transcripción celular
E1	Replicación del DNA viral, mantenimiento del plásmido
E2	Regulación de la transcripción viral
E4	Unión con la citoqueratina y otras funciones
E5	Transformación celular a través de interacción con receptores del factor de crecimiento
L2	Proteína menor de la cápside
L1	Proteína mayor de la cápside

Modificada a partir de Muñoz N[9].

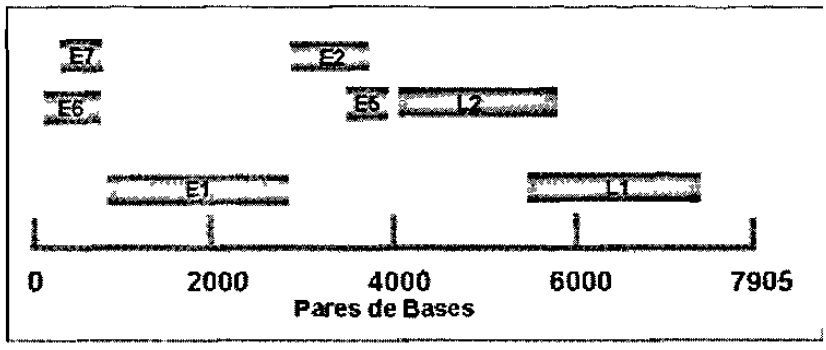

Figura 5. Marcos de lectura del HPV tipo 16. El DNA presenta tres marcos de lectura, por lo que las cajas representan los diferentes genes en cada uno de los marcos. Las cajas designadas como L codifican para las proteínas estructurales y las E para las proteínas regulatorias. Modificado a partir de Matlashewski G[26].

1.4.1.1B. Epidemiología del HPV

La mayoría de los datos de epidemiología sobre HPV han sido revisados y publicados en la monografía de la IARC (International Agency for Research on Cancer). El mejor ejemplo es un estudio realizado por Bosch y colaboradores en el 1995, donde se analizaron 932 biopsias de cáncer de todo el mundo[28]. El análisis inicial mostró una prevalencia de HPV de un 93%. Posteriormente Jacobs y colaboradores en el 1997, analizando las mismas muestras pero utilizando diferentes juegos de iniciadores, encontraron una prevalencia de HPV de un 99%[29].

En México, existen estudios de detección de HPV realizados en población de diversos estados: 1) en 1992 González-Garay y cols. [30] detectaron HPV 16 y 18 utilizando la técnica de Southern blot, en muestras de CaCU en dos ciudades diferentes, encontrando una prevalencia de un 29% y un 7% de HPV16 y 18, respectivamente en la Cd. de Monterrey, mientras que en la Cd. de México encontraron un 26% y un 10% de HPV16 y 18 también respectivamente: 2) en la Cd. de Cuernavaca en 1993, Tamayo-Legorreta y cols. [31], utilizando la PCR y

sondas especificas para los HPVs 6, 11, 16, 18 y 33, encontraron un 5.3% de positividad en citologías normales y un 8.6% en citologías anormales; 3) en la Cd. de México se han realizado varios estudios para la detección de HPV, encontrándose desde un 50-87% en pacientes con CaCU, 30-83% en neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y desde un 13-31% en controles sanos[32], [33], [34]; 4) la frecuencia de HPV en el estado de Guerrero es de 90%-93% para las NIC detectadas por PCR y de un 35-50% para controles[35], [36], [37].

1.4.1.2 Integración del HPV

Durante el ciclo normal del HPV, el DNA viral está en forma episomal en el núcleo de la célula infectada. Esto se refleja en las infecciones por HPV productivas, histológicamente clasificadas como lesiones premalignas de bajo riesgo (NIC I). Sin embargo, en las lesiones de alto grado (NIC II-III) y en los carcinomas, los genomas virales se encuentran integrados a la secuencia del huésped. La frecuencia de regresión espontánea de la infección disminuye de los NIC I a los NIC III, lo cual se correlaciona con el incremento de integración del HPV. Estos cambios sugieren que la recombinación del DNA viral en la secuencia celular del huésped da como resultado un ventaja de crecimiento y por consiguiente su transformación a célula cancerosa. Se sabe que para la integración del virus usualmente se requiere de la ruptura de los marcos de lectura de E1, E2 o ambos, dando como resultado la pérdida de expresión de estas proteínas. Los genes E1 y E2 actúan como represores de los promotores que dirigen la expresión de E6 y E7, por lo que la integración del virus conlleva a la sobreexpresión de estas oncoproteínas[38]. En el apartado 1.4.1.1 se explica la acción que producen estas oncoproteínas a nivel del ciclo celular.

Otra consecuencia de la integración viral es la activación transcripcional de proto-oncogenes celulares por los promotores virales. Aunque se ha

demostrado la intregración cerca del proto-oncogen *myc* y c-fos, se ha observado que los sitios de integración son variables y no están correlacionados con la malignidad de los carcinomas[39], [40].

Se piensa que la integración es una alteración genética irreversible que pudiera servir como marcador molecular de riesgo de progresión para carcinomas invasores y lesiones de alto riesgo.

1.4.1.3 Número de copias del HPV

Otro factor poco estudiado, es la carga viral presente en las infecciones por HPV. Existen algunos estudios en los cuales se ha observado que el número de copias de HPV tipo 16 es mayor al incrementarse la gravedad de la neoplasia (NICI, NICII, NICIII), y por consiguiente el riesgo de presentar CaCU es proporcional a la cantidad de HPV tipo 16 presente en las células[41], [42], [43], [44]. Sin embargo, un estudio en el cual se analizaron muestras de CaCU se observó que el número de copias disminuía al incrementar el estadio clínico, pero se asociaba con el grado de diferenciación histológica[45].

1.4.2 FACTORES INTRÍNSECOS ASOCIADOS AL CaCU

Aunque las infecciones por HPVs tienden a ser crónicas, parece que en la mayoría de los casos se logra una completa resolución. Se conoce que el intervalo de tiempo requerido entre la infección inicial por HPV y la presencia de cáncer *in situ* varía desde unos pocos meses hasta varias décadas. Por otro lado, aún no se ha establecido porqué tan solo una pequeña proporción (sólo

un 1%) de las mujeres infectadas por HPVs progresan a cáncer. Estos aspectos implican que la infección por HPVs no es suficiente para el desarrollo del proceso maligno y que otros factores intrínsecos (genéticos) de las pacientes están implicados en el CaCU.

Dentro de los factores intrínsecos se destacan varios de especial interés. El primero se refiere al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés, *mayor histocompatibility complex*) y la inmuno-tolerancia a la infección crónica viral[14]; mientras que el segundo, a la predisposición genética al CaCU conferida por un polimorfismo en el gen codificante para la proteína supresora de tumores p53[55]. También se piensa que la activación de Ras podría ser un evento adicional en la patogénesis de este cáncer.

1.4.2.1 Complejo mayor de histocompatibilidad

El sistema inmune juega un papel importante en la prevención del desarrollo de las enfermedades asociadas a HPV, ya que los pacientes con cáncer y SIDA presentan una incidencia mayor de enfermedades por HPV. También se ha reportado una alta incidencia de lesiones cervicales asociadas a HPV e infecciones múltiples de HPV en pacientes inmunosuprimidos[14, 46, 47].

El reconocimiento de los antígenos por medio de las células T está restringido por los productos polimórficos del MHC, una región genética muy grande que codifica para las moléculas de clase I y II, así como para otras proteínas. Las moléculas del MHC son extremadamente polimórficas, con hasta 150 alelos comunes o más, para cada gen individual[48].

Se sabe que las moléculas de clase I y II se unen a antígenos peptídicos extraños y forman complejos que son reconocidos por linfocitos T específicos de antígeno. Los antígenos asociados a las moléculas de clase I son reconocidos por los linfocitos T citolíticos $CD8^+$, mientras que los antígenos asociados a las moléculas de clase II son reconocidos por los linfocitos colaboradores $CD4^+$. Estos productos son codificados por un grupo de genes distribuidos en varios loci a lo largo del cromosoma 6. El MHC humano es muy grande (alrededor de 3,500 kb) y se organiza de la siguiente forma: 1) genes de clase II (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR), los cuales son expresados por las células presentadoras de antígenos (casi todas pertenecientes al sistema inmune) y por algunos epitelios, 2) genes del complemento, 3) genes de proteínas de choque térmico y citoquinas (TNF, LT y LT-β), y 4) genes de clase I (HLA-B, HLA-C y HLA-A), éstos son expresados por la mayoría de las células somáticas. Los genes son llamados HLA (del inglés, human leukocyte antigens) debido a que se expresan en la superficie de los leucocitos (figura 6)[48].

Existe una gran controversia en cuanto a la asociación del MHC y el CaCU, sin embargo se han reportado asociaciones entre genes de la región HLA con NIC y CaCU, particularmente los de clase II (HLA-DQ y HLA-DR) y algunos de sus haplotipos. Helland y cols.[49] encontraron que los alelos DQA1*030X y DQB1*0301 están incrementados, mientras que DQA1*0201 y DQB1*0201 están disminuidos en pacientes con carcinoma escamoso del cérvix (SCCC) cuando se compararon con controles, mientras que el HPV no está asociado a ninguno de estos alelos. Montoya y cols. [50] sólo encontraron una tendencia en el incremento del alelo DQB1*0302 en pacientes con SCCC.

También existen algunos estudios en donde se ha encontrado una asociación entre los haplotipos de HLA y NIC en diferentes poblaciones: los haplotipos DRB1*0401-DQB1*0301, DRB1*1101-DQB1*0301 se asocian con NIC en

pacientes británicas, el haplotipo DQA1*0102-DQB1*0602 incrementa el riesgo de desarrollar NIC al tener una infección con HPV 16[51].

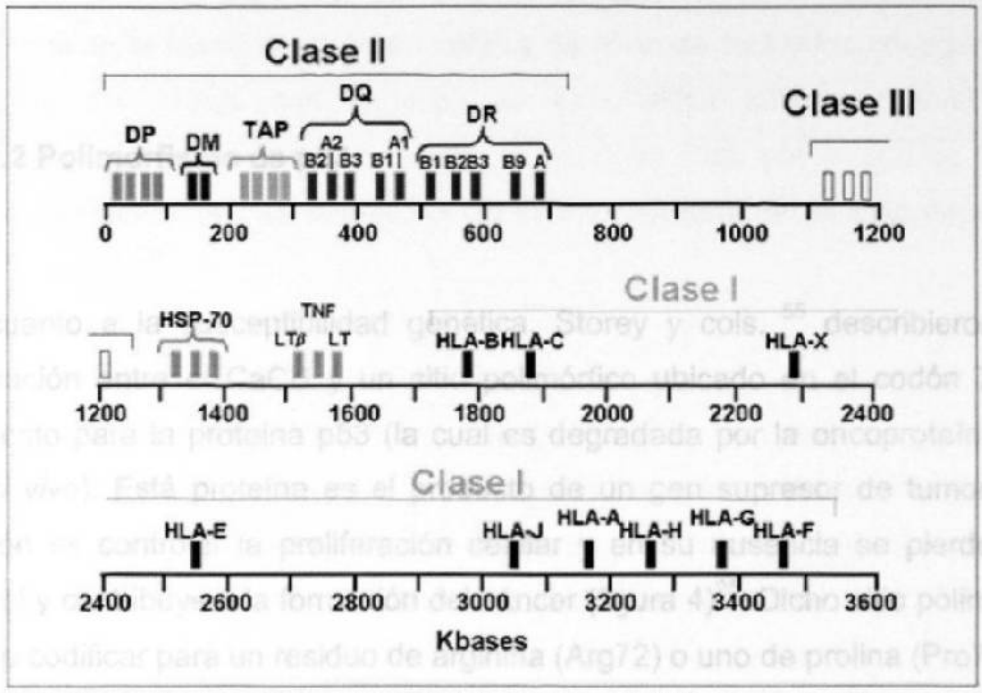

Figura 6. Mapa de los genes del MHC humano. HLA-F, G, H, J y X son moléculas similares a las de clase I. Este mapa está simplificado para excluir a otros genes similares a los de clase I y II, genes sin interés inmunológico, y numerosos genes de función desconocida. El patrón de los genes de clase II puede variar según el alelo heredado. Los genes DM, TAP y el proteosoma contribuyen al ensamblaje de la molécula de MHC; C2, C4A, C4B y el factor B son proteínas del complemento; HSP-70 es una proteína de shock térmico; la linfotoxina (LT), linfotoxina β (LFβ) y el factor de necrosis tumoral (TNF) son genes de citoquinas. Modificado a partir de Abbas AK[48].

En población hispana se ha encontrado asociación significativa entre el CaCU invasor y el haplotipo DRB1*1501-DQB1*0602[52]. En mujeres hondureñas se encontró un RR de 3.45 en pacientes con CaCU que presentaban el alelo HLA-DQA1*0301[53]. Mientras que en un estudio realizado en población mexicana, se observó que la frecuencia de HLA-A2 y HLA-DR5 se encontraba incrementada en pacientes, al compararse con controles sanos[54].

La base teórica es que los antígenos virales de los HPVs son presentados a las células T por moléculas del complejo HLA y podría asumirse que algunas de estas moléculas influyen la respuesta inmune y son responsables de la pérdida de la vigilancia inmunológica contra el proceso maligno.

1.4.2.2 Polimorfismo de p53

En cuanto a la susceptibilidad genética, Storey y cols. [55] describieron una asociación entre el CaCU y un sitio polimórfico ubicado en el codón 72 del transcrito para la proteína p53 (la cual es degradada por la oncoproteína viral E6 *in vivo*). Está proteína es el producto de un gen supresor de tumor cuya función es controlar la proliferación celular y en su ausencia se pierde este control y contribuye a la formación del cáncer (figura 4)[25]. Dicho sitio polimórfico puede codificar para un residuo de arginina (Arg72) o uno de prolina (Pro72). La oncoproteína E6 de los HPVs 16 y 18 degrada más efectivamente a p53Arg que a p53Pro *in vivo*. En éste estudio, el alelo Arg72 estuvo presente en el 76.7% de las pacientes afectadas y tan solo en un 36% de las controles sanas, mientras que el genotipo Pro/Arg estuvo presente en un 16.7% en los tumores comparado con un 58.5% de los controles. Con base en lo anterior, concluyeron que el genotipo homocigoto Arg72/Arg72 confería una susceptibilidad 7 veces mayor a la tumorogénesis por HPVs oncogénicos que el genotipo heterocigoto. No se encontró diferencia significativa en la frecuencia del alelo homocigoto para Pro72. De esta forma, el polimorfismo que codifica para el alelo de Arg se le ha postulado como un factor de riesgo importante en el desarrollo de cánceres asociados con HPVs. Makni[56] y Zhbe[57] confirmaron la asociación del polimorfismo de p53, mientras que un sin fin de estudios rechazan esta asociación con el CaCU[58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72].

1.4.2.3 Mutaciones en los genes RAS

Se ha demostrado experimentalmente que el DNA de HPV 16 coopera junto con H-ras en la transformación de células de riñón de rata y los oncogenes de HPV de alto riesgo son capaces de inmortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos ayudados por el oncogen Ras, por lo que se piensa que la activación de Ras podría ser un evento adicional en la patogénesis de este cáncer[73], [74].

Las mutaciones presentes en los oncogenes Ras son muy frecuentes en tumores sólidos humanos. Los adenocarcinomas pancreáticos presentan un 90% de mutaciones mientras que los cánceres de células pequeñas de pulmón, colon, tiroides, seminomas y melanomas presentan alrededor de un 30%[75], [76], [77].

La familia Ras está constituida por 3 genes: N-ras, H-ras y K-ras y aunque tienen estructuras genéticas diferentes, todas codifican para proteínas de 189 aminoácidos, genéricamente designadas como p21 por su peso molecular (21Kda). La proteína ras normal actúa en la célula como un elemento transductor de señal, como intermediario de una cascada, recibe señales estimulatorias del crecimiento, frecuentemente liberadas por receptores mitógenos de la superficie celular, y las pasa hacia las moléculas blanco que a su vez estimulan la proliferación celular. Estos genes adquieren propiedades malignas por mutaciones puntuales que afectan la codificación del aminoácido 12, 13 ó 61 de su respectiva proteína[75].

Wong[78] encontró una frecuencia de mutaciones en el codón 12 de K-ras de un 61%, mientras que de un 35% en el oncogen H-ras (codón 12) en población oriental. Sin embargo, estos resultados no han sido reproducibles en otras poblaciones, ya que las frecuencias de mutaciones tanto para K-ras y H-ras son muy bajas (24% las más altas en ambos oncogenes)[79], [80], [81], [82]. A *la fecha* existen muy pocos reportes relacionados con la búsqueda de mutaciones en estos genes, siendo los resultados muy controversiales.

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

Debido a que el CaCU es la segunda causa de muerte por neoplasia en México, es necesario la realización de proyectos de investigación que permitan conocer la epidemiologia y patogénesis molecular de la enfermedad. Los HPVs oncogénicos están claramente implicados en la patogénesis de la infección crónica del cérvix y del CaCU, pero la mayoría de la evidencia demuestra que la progresión al cáncer es muy lenta y solo ocurre en un número muy limitado de pacientes que son incapaces de resolver *satisfactoriamente* la *infección viral*. Esto último revela la importancia de los factores intrínsecos del huésped en el desarrollo de la neoplasia. Hasta el momento no existen estudios que valoren la asociación simultánea entre HPVs, y los factores intrínsecos (MHC, polimorfismo de p53 y mutaciones en los oncogenes K- y H-ras) como causas del CaCU. Este conocimiento es importante, debido a que aunque cada uno de esos factores ha sido estudiado por separado, además es sabido que en el desarrollo de las neoplasias puede *existir un efecto sinérgico de dos o más* factores. De acuerdo con ésto, conocer las interacciones y asociaciones entre los diferentes genes a analizar nos permitirá entender mejor la génesis de la enfermedad para lograr en última instancia su prevención y tratamiento.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la posible asociación de CaCU con: factores extrínsecos (tipos de HPVs, integración del HPV y número de copias de HPV) y factores intrínsecos (HLA, polimorfismo en el gen p53 y mutaciones en los oncogenes K- y H-ras) en mujeres con y sin CaCU.

2.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar la extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica y de biopsias de tejido fresco, para establecer un banco de DNA proveniente de las pacientes con y sin CaCU.

2. Implementar la técnica de PCR e hibridación reversa para la tipificación de 27 tipos de HPVs a partir del DNA aislado de las biopsias.

3. Implementar la técnica de PCR utilizando iniciadores específicos para tipificar los alelos DQB, DR3 y DR4 a partir del DNA aislado de sangre periférica.

4. Implementar la técnica de PCR utilizando iniciadores específicos descrita por Storey y cols.[55], para la detección del polimorfismo en el codón 72 del gen p53, a partir del DNA aislado de sangre periférica.

5. Determinar si existe integración del HPV tipo 16 en el genoma del huésped.

6. Determinar el número de copias virales del HPV tipo 16.

7. Determinar los alelos de DQA en el DNA recuperado a partir de sangre periférica utilizando la técnica de PCR e hibridación reversa estandarizada en el laboratorio.

8. Determinar las mutaciones presentes en el codón 12 y 13 del oncogen K-ras y codón 12 del oncogen H-ras, mediante la técnica de RFLP´s.

9. Determinar la asociación entre los tipos y frecuencias de HPVs en los DNAs de las biopsias de mujeres con y sin CaCU.

10. Determinar la asociación entre los alelos DQA, DQB, DR3 y DR4 en mujeres con y sin CaCU.

11. Determinar la asociación entre los haplotipos HLA DQA-DQB en mujeres con y sin CaCU.

12. Determinar la asociación entre los genotipos del polimorfismo en el codón 72 del gen p53 en mujeres con y sin CaCU.

13. Determinar la frecuencia de mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras y el codón 12 del oncogen H-ras en mujeres con y sin CaCU.

CAPITULO III

ESTRATEGIA GENERAL

Para cumplir los objetivos planteados se siguió la estrategia general ilustrada y detallada a continuación (figura 7 y 8).

1. Se recolectaron un total de 185 biopsias de cérvix de pacientes (85 con y 100 sin CaCU) de las cuales además se obtuvo sangre periférica con EDTA, se extrajo el DNA genómico de las biopsias y sangre y se formó un banco de DNA.

2. Se estimó la calidad y concentración de cada uno de los DNAs en gel de agarosa al 1%.

3. A partir del DNA proveniente de las biopsias y utilizando iniciadores específicos, se amplificaron por PCR las regiones correspondientes del genoma de HPV para la detección de: 1) diferentes tipos de HPV (L1) y 2) E1, E2, E6 y E7 del HPV-16.

4. Así mismo, se amplificaron por PCR los codones 12 y 13 del oncogen K-ras y el codón 12 del oncogen H-ras.

5. A partir del DNA proveniente de sangre, utilizando iniciadores específicos para cada uno, se amplificaron por PCR las regiones correspondientes para la detección de: HLA-DQA, HLA-DQB, HLA-DR3, HLA-DR4 y el polimorfismo en el codón 72 de p53.

6. Se verificó el éxito de las amplificaciones sometiendo el producto amplificado a electroforesis en gel de agarosa al 1 y 2%, según fue necesario.

7. En el caso del polimorfismo en el codón 72 de p53, para la resolución efectiva de los fragmentos dado sus tamaños pequeños, se recurrió a electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12%, teñido con bromuro de etidio y se observaron con luz ultravioleta.

8. Se generaron imágenes digitalizadas utilizando el equipo de fotodocumentación Gel Doc y se analizaron con el programa computacional Molecular Analyst.

9. En el caso de la detección de tipos de HPVs y HLA DQA, se realizó la hibridación reversa del producto amplificado con sondas oligo-tipo-específicas y oligo-alelo-específicas, respectivamente.

10. Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos para cada uno de los objetivos planteados.

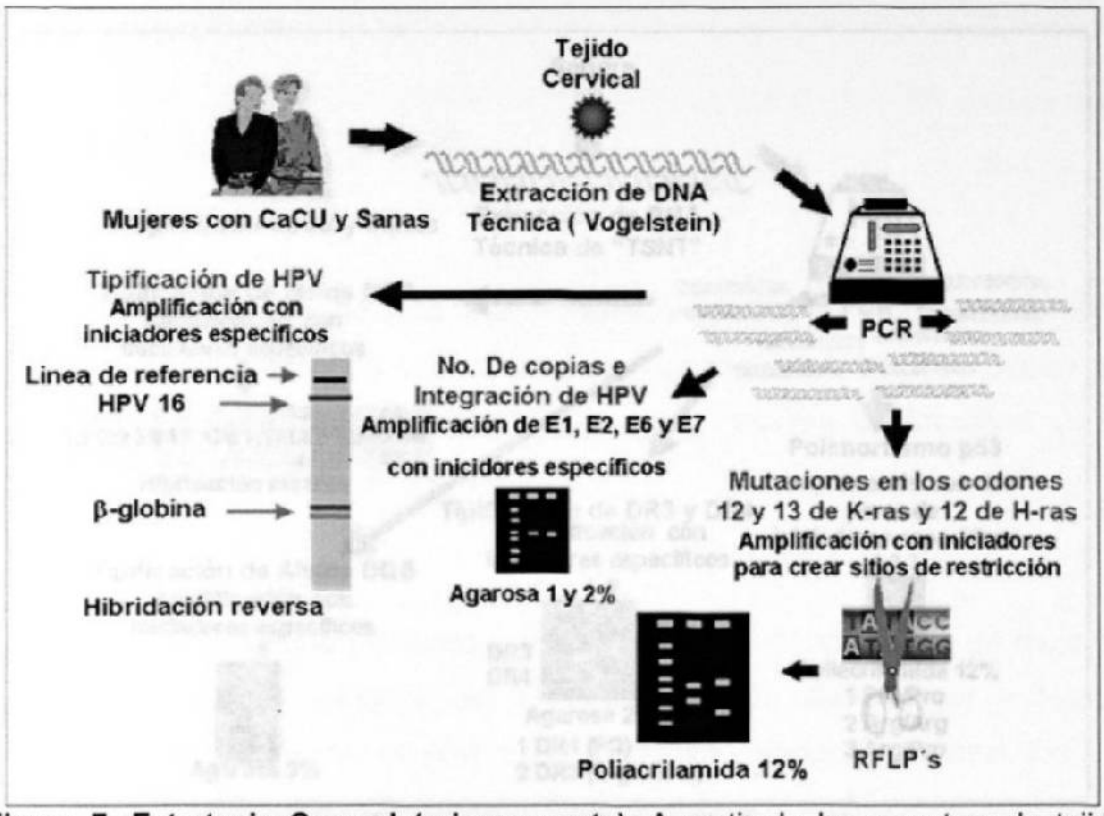

Figura 7. Estrategia General (primera parte). A partir de las muestras de tejido cervical se realizó la extracción de DNA, para continuar con la PCR utilizando iniciadores específicos según fue el caso para la tipificación de HPVs usando posteriormente hibridación reversa, la detección del número de copias e integración del HPV 16 usando electroforesis en gel de agarosa y la detección de mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras y 12 de H-ras usando RFLPs.

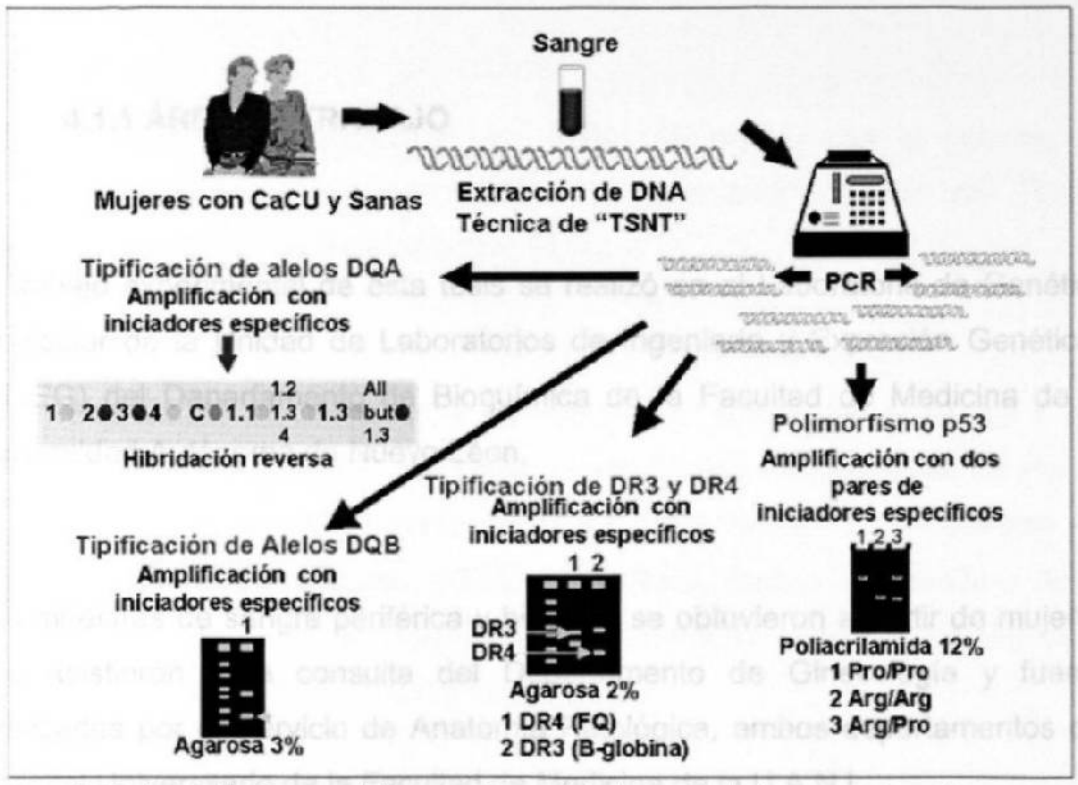

Figura 8. Estrategia General (segunda parte). A partir de las muestras de sangre se realizó la extracción de DNA, para continuar con la PCR utilizando iniciadores específicos según fue el caso para la tipificación de los alelos DQA usando posteriormente hibridación reversa, la tipificación de los alelos DQB, DR3 y DR4 usando electroforesis en geles de agarosa, y la detección del polimorfismo de p53 usando electroforesis en geles de poliacrilamida.

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 ÁREA DE TRABAJO

El trabajo experimental de esta tesis se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG) del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo Léon.

Las muestras de sangre periférica y biopsias se obtuvieron a partir de mujeres que asistieron a la consulta del Departamento de Ginecología y fueron analizadas por el Servicio de Anatomía Patológica, ambos departamentos del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

4.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

De cada una de las mujeres a analizar con y sin CaCU se obtuvieron muestras de sangre periférica tratada con EDTA y una biopsia de tejido cervical, tomada de la pieza quirúrgica, obtenida por histerectomía terapéutica. La muestra de sangre se conservó a 4°C y el tejido cervical se conservó en un tubo estéril a –70°C hasta el aislamiento del DNA.

4.1.3 REACTIVOS QUÍMICOS

Para el aislamiento de DNA se utilizó EDTA, SDS, NaCl, trizma base, tritón X-100 y fenol, adquiridos en Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, EUA), Proteinasa K de Promega (Madison, WI, EUA), así como ácido clorhídrico, cloroformo, alcohol isoamílico y etanol de Merck de México.

La amplificación y detección de los HPVs se realizó con el estuche de investigación "HPV Consensus PCR and Genotyping" donado por Roche Molecular Systems, Inc. (Alameda CA, EUA).

La tipificación de los alelos DQA se realizó con el estuche comercial " The AmpliType HLA DQA1 PCR Amplification and Typing Kit", adquirido de Perkin Elmer (Branchburg, New Jersey, U.S.A.). Para la hibridación reversa en mancha también se utilizaron EDTA, SDS, NaCl, fosfato monosódico, ácido *cítrico y citrato de sodio, de Sigma* Chemical Company y peróxido de hidrógeno de TJ Baker (San Antonio, TX, EUA).

Las amplificaciones del HPV para verificar integración y número de copias, de los alelos DQB, DR3 y DR4, del polimorfismo del gen p53, así como para la identificación de mutaciones en los codones 12 y 13 *del oncogen* K-ras *y el* codón 12 del oncogen H-ras, se realizaron con iniciadores sintetizados por Gibco-BRL (Rockville, MD, EUA). Se utilizaron también enzima Taq DNA polimerasa, buffer de reacción, cloruro de magnesio y dNTPs de Promega (Madison, WI, EUA) y aceite mineral de Sigma Chemical Company (Saint Louis, Missouri, EUA).

Para la identificación de las mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras y el codón 12 del oncogen H-ras, se utilizaron las enzimas de restricción *Bst* NI, *Hae* III y *Msp* I de New England Biolabs (Beverly, Ma, EUA).

Para la electroforesis en geles de agarosa se utilizó agarosa, trizma base, EDTA, *ácido bórico*, *azul de bromofenol*, *xilene cianol* y *bromuro de etidio* mientras que para las electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida, N,N-metilenbisacrilamida, TEMED, EDTA, trizma base y bromuro de etidio, todos los anteriores de Sigma Chemical Company. Como marcadores de peso molecular en las electroforesis se utilizó el DNA del plásmido pUC18 y pBS digeridos con las enzimas de restricción *Hae* III o *Alu* I y el DNA de lambda digerido con *Pst* I. Las enzimas de restricción fueron adquiridas en New England Biolabs y los DNAs plasmídicos se obtuvieron mediante técnicas de mediana escala realizadas en nuestro laboratorio siguiendo procedimiento estándares[84]. El marcador de peso molecular corresponde al fago lambda, fue adquirido en Promega (Madison, WI, EUA).

4.1.4 MATERIAL DE LABORATORIO

Los tubos de microcentrífuga (de 0.2, 0.5, 1.5 y 2.0 ml), las puntillas (de 0.01, 0.2 y 1 ml) para las micropipetas de precisión, los tubos cónicos de *polipropileno* (de 15 y 50 ml) y los guantes de látex fueron comprados a Cell Associates, Inc. (Houston, TX, EUA). Las micropipetas de precisión de volumen variable de 2, 10, 20, 200 y 1000 µl fueron obtenidos de Rainin Instruments (Woburn, MA, EUA). También se utilizó una pipeta repetidora Eppendorf (Westbury, NY, EUA).

4.1.5 EQUIPO DE LABORATORIO

En el aislamiento de DNA se utilizó una centrífuga clínica de mesa Beckman TJ6, un vortex modelo 37600 y un Thermomixer de Thermolyne (Dubuque, IA, EUA), una balanza granataria Sartorius modelo 1206 MP (Cambh, Göttingen, Alemania) y una microcentrífuga Eppendorff modelo 5412 (Hamburg, Alemania). Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador PTC-100 JM-Research (Watertown, MA, EUA) y un Omni-E Hydbaid (Reino Unido).

Para analizar los productos amplificados se utilizaron cámaras de electroforesis horizontales fotodyne (Hartland, WI, EUA), cámaras verticales de 20X20 cms y una fuente de poder modelo 250 ambos de Gibco-BRL.

Para analizar los geles tanto de agarosa como de poliacrilamida, se utilizó el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000 y el programa Molecular Analyst de Bio Rad (Hercules, CA, EUA).

4.1.6 APOYO COMPUTACIONAL

El procesamiento de datos fue realizado en una computadora modelo Acer Power P75 y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara de video, una fuente de luz UV y una computadora (Gel Doc System, BIO RAD). El procesador de texto utilizado fue Microsoft Word 97 (Microsoft Corporation), procesadores gráficos Microsoft Power Point 97 (Microsoft Corporation), Microsoft Excel 97 (Microsoft Corporation), Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1 (Adobe System Incorporated y UMAX Scan

(UMAX Scanner Driver, Impact Research, Inc). Las bases de datos utilizados por vía INTERNET fueron: *Entrez* (National Center for Biotechnology Information (NCBI); *Gen Bank* (ICEBEG, Trieste, Italia). El programa utilizado para comunicación en la red fue el Microsoft Internet Explorer versión 4.0

4.2 MÉTODOS

4.2.1 TIPO DE ESTUDIO

Es un estudio de casos y controles, tipo prospectivo y descriptivo. La investigación constó de dos aspectos: uno de tipo clínico y el otro experimental. En la investigación clínica, se diseñó un cuestionario (anexo I) que incluía datos clínico-patológicos, los cuales se correlacionaron con los datos moleculares obtenidos en la parte experimental.

4.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LAS PACIENTES

El grupo de casos fueron pacientes que se les había diagnosticado CaCU por citología. El grupo de controles fueron pacientes que se les realizó *histerectomía por incontinencia urinaria*, miomatosis, etc. y que no presentaban CaCU de ningún tipo. Se incluyeron en el estudio pacientes a las cuales se les realizó histerectomía terapéutica por CaCU u otra causa en el período de septiembre de 1998 a marzo de 2001 por los Departamentos de Ginecología y Oncología del Hospital Universitario "Dr. J. Eleuterio González" de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. A todas las pacientes se les explicó en que consistía

el estudio y a las que aceptaron participar en el estudio se les pidió que contestaran el cuestionario clínico así como su autorización antes de la cirugía, y se les solicitó que firmaran una carta de consentimiento informado (Anexo I).

4.2.3 MUESTRAS DE CASOS Y CONTROLES

Se analizaron un total de 185 pacientes, de los cuales 85 fueron casos y según los criterios de la FIGO (Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstétrique)[83], 46 presentaban cáncer invasor y 39 estaban en etapa de *in situ*. El grupo de controles se constituyó de 100 pacientes con un diagnóstico histopatológico libre de cáncer o cualquier estadio premaligno. Las muestras fueron analizadas por el Departamento de Patología del Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. De todas las pacientes analizadas se obtuvieron muestras de sangre periférica con EDTA la cual se almacenó a 4°C hasta el momento de la extracción de DNA y una biopsia del cérvix la cual fue tomada por un residente del Servicio de Anatomía Patológica y depositada en un tubo eppendorf de 2 ml utilizando guantes y pinzas estériles y se transportaron en hielo al laboratorio, en donde se almacenaron a -70°C hasta el momento de su procesamiento.

4.2.4 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

4.2.4.1 Extracción de DNA genómico a partir de las muestras de sangre

Se colocaron 5 ml de sangre con anticoagulante en un tubo cónico de polipropileno de 15 ml. Las células se lisaron con 2 ml de solución de lisis TSNT

(2% Tritón, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA), mezclando mediante inversión por varios segundos. Posteriormente, se agregaron 5ml de fenol saturado (con Tris-HCl 0.1M, pH 8) y 1 ml de sevag (Cloroformo-alcohol isoamílico 24:1), se mezcló para homogenizar por completo utilizando un vortex. En seguida se agregaron 2ml de buffer TE (Tris 10 mM-EDTA 1mM pH 7.4) y se centrifugó durante 15 min a 10,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo de 15 ml. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se agitó lentamente por inversión hasta observar el DNA precipitado, como una hebra blanca. Utilizando una micropipeta, el DNA se recuperó y transfirió con cuidado a un tubo Eppendorff de 2ml. Se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm en una microcentrífuga y la pastilla obtenida se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente, se decantó el etanol, se secó el DNA y finalmente se resuspendió en TE[84].

4.2.4.2 Extracción de DNA genómico a partir de las biopsias de cérvix

Se descongelaron las biopsias y en condiciones asépticas se pesó de 10 a 50 mg de tejido. Utilizando una hoja de bisturí, se cortó en pedacitos lo más pequeños posibles y se pasaron a tubos Eppendorff de 1.5 ml, los cuales contenían 1 ml de solución de lisis (500 mM Tris, 20 mM EDTA, 10 mM NaCl, pH 9), 50 µl de SDS 10% y 37.5 µl de proteinasa K 10 mg/ml. Se incubaron en un Termomixer a 48°C con agitación vigorosa durante 12 a 14 horas, para finalmente inactivar la enzima 95°C durante 10 min.

Se transfirió todo el contenido a tubos de 15 ml para realizar una extracción fenol:cloroformo 1:1. Usando el vortex se agitó durante 5 min y luego se centrifugó durante 10 min a 10,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a otro tubo de 15 ml, repitiendo la extracción dos veces más.

La fase acuosa final se transfirió a un tubo de 15 ml, se agregaron 0.33 volúmenes de acetato de amonio 10 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100%. Se mezcló suavemente por inversión, se dejó precipitar a -70°C durante una hora. El DNA se recuperó con una micropipeta y se transfirió a un tubo eppendorf de 2ml y se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Esta se secó y se resuspendió en TE[84].

4.2.4.3 Evaluación de la calidad y la concentración del DNA

Para asegurar que el DNA se resuspendiera homogeneamente, se dejó durante 12 a 14 horas en una plataforma agitadora vertical. Finalmente, se procedió a realizar diluciones 1:10 para determinar su concentración y calidad.

Se preparó un gel de agarosa al 1% en buffer TBE 1X (0.09 M Tris-Borato y 0.002 M EDTA, pH 8), disolviendo con calor. Una vez gelificado en el molde, se depositó el gel en una cámara de electroforesis y se cubrió con el mismo buffer. Se mezcló 1µl de una dilución 1:10 de la muestra a cuantificar con 4 µl de TE 1X y 1 µl de jugo azul 6X (0.3% azul de bromofenol, 0.3% xilencianol y 30% glicerol). De la misma manera, se preparó una serie de estándares cambiando el DNA a cuantificar por cantidades conocidas y variables de las muestras estándares. La serie de preparaciones se colocó en los carriles del gel y se realizó electroforesis horizontal, inicialmente a 80 V mientras se internaba el colorante en el gel y posteriormente a 110 V por alrededor de 1 hora (dejando correr el azul de bromofenol tres cuartas partes del gel).

Concluida la electroforesis, el gel se colocó en una solución de bromuro de etidio a 2 µg/ml por 5 ó 10 min y luego el gel se lavó varias veces con agua corriente para quitar el exceso de bromuro y así proceder a su observación en un transiluminador de luz UV. Se determinó la concentración del DNA por comparación de la intensidad de la fluorescencia de la banda de interés con la de los estándares, utilizando el software Molecular Analyst de Bio Rad. La integridad se evaluó tomando en cuenta la intensidad del barrido, la cual determina el grado de degradación; la ausencia de tal barrido indica que el DNA extraído está íntegro.

4.2.5 ANÁLISIS DE FACTORES EXTRÍNSECOS (HPV)

4.2.5.1 Detección de 27 tipos de HPV

Para la detección del tipo viral de cada una de las muestra se utilizó el estuche "HPV Consensus PCR and Genotyping System". Este estuche está basado principalmente en 3 procesos: amplificación de la secuencia blanco mediante PCR, hibridación de los productos amplificados a sondas oligo-tipo-específicas, y detección del producto amplificado unido a las sondas, mediante una reacción de desarrollo de color. El desarrollo de este ensayo de PCR involucra la región L1 del genoma de HPV, la cual es una región consenso para todos los HPVs, y oligonucleótidos (oligos) biotinilados que flanquean la región L1 (figura 9).

En la reacción de amplificación, cada pareja de oligos biotinilados se une a la región blanco y después, catalizados por la DNA polimerasa, usando un exceso de desoxiribonucleósidos tri-fosfatados (dNTPs) en la mezcla de reacción, se extienden en la dirección 5´ a 3´. De esta manera, se generan copias del DNA

flanqueado por los oligos, secuencias llamadas amplicones o productos amplificados. En la misma reacción se adicionan unos oligos biotinilados que amplifican una porción del gen de la β-globina presente en todas las células humanas; este producto amplificado nos sirve como control interno de la reacción.

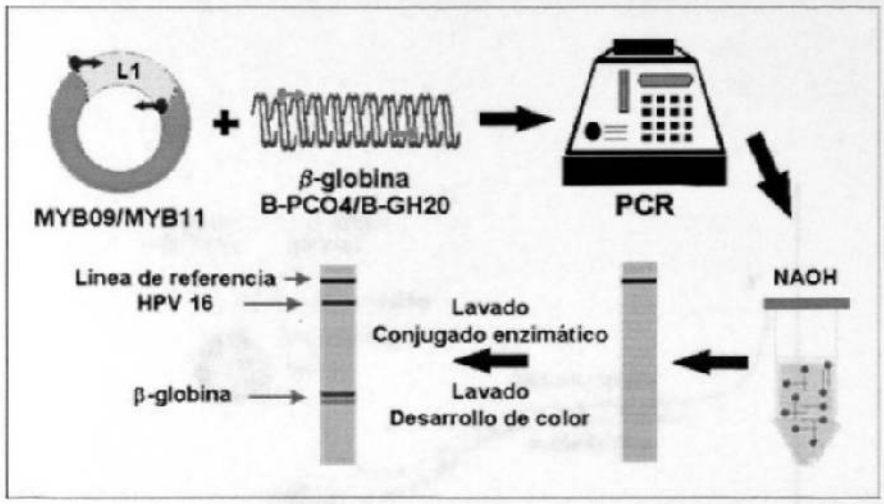

Figura 9. Estrategia para la detección de HPV. Se amplificó la región L1 de los HPVs y una porción del gen de la β-globina como control interno. Posteriormente los productos amplificados se desnaturalizaron con NaOH y se hibridaron con las 27 sondas de los diferentes tipos de HPVs. Finalmente se realizaron lavados seguidos de la reacción de desarrollo de color para así proceder a la interpretación de los resultados.

Por otro lado, sondas oligonucleotídicas específicas para 27 tipos de HPV (tabla 3) y 2 para el gen de la β-globina, están en forma de cadena sencilla unidas a una membrana de nylon para capturar los productos amplificados correspondientes. El sistema de detección usado en el ensayo es un conjugado de estreptovidina-peroxidasa de rábano (SA-HRP) que se une a los productos amplificados biotinilados capturados en la membrana por las sondas. Los sustratos usados para la formación de color en el ensayo son el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y la tetrametilbencidina (TMB) (figura 10).

Tabla 3. Tipos de HPVs identificados por el estuche

Tipos de HPVs asociados a cáncer (HPVs de alto riesgo)	Tipos de HPVs no asociados a cáncer (HPVs de bajo riesgo)
16,18.26,31,33,35,39,45,51,52,5 5,56,58,59,68 (ME180), MM4 (W13B), MM7 (P291), MM9 (P238A)	6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66, MM8 (P155)

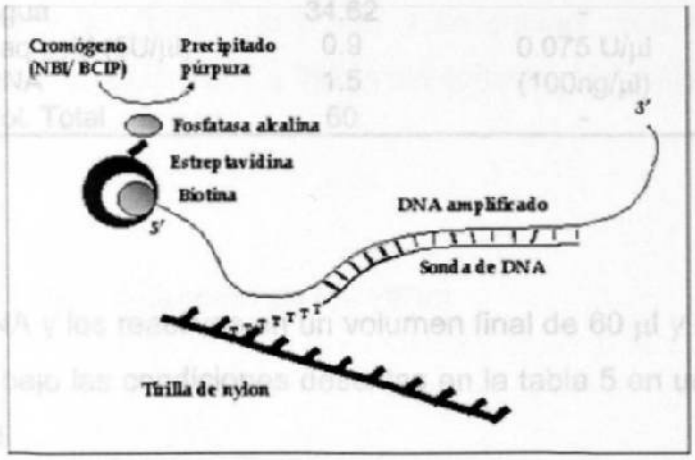

Figura 10. Esquema de una hibridación reversa. La sonda de DNA es retenida al papel de nylon por medio de una cola de poli-T. Después de que el producto amplificado ha sido marcado con biotina, este se incuba con la sonda y se realizan lavados de alta astringencia para eliminar las uniones no específicas, se agrega el conjugado de estreptovidina-fosfatasa y posteriormente se agrega el sustrato de la enzima que va a producir color.

4.2.5.1A Amplificación del HPV

Se realizó la reacción de PCR a partir del DNA proveniente de las biopsias de cérvix en una campana en condiciones de esterilidad como se describe en la tabla 4.

Tabla 4. *Condiciones de amplificación para la detección de HPVs*

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	6	1X
MYB09 (50 µM)	0.6	0.5 µM
MYB11 (50 µM)	0.6	0.5 µM
HMB01 (50 µM)	0.06	0.05 µM
BPC04 (50 µM)	0.06	0.05 µM
BGH20 (50 µM)	0.06	0.05 µM
$MgCl_2$ (25 mM)	14.4	6 mM
dNTPs (10 mM)	1.2	0.2 mM
Agua	34.62	-
Taq gold (5U/µl)	0.9	0.075 U/µl
DNA	1.5	(100ng/µl)
Vol. Total	60	-

Se mezcló el DNA y los reactivos en un volumen final de 60 µl y se llevó a cabo la amplificación bajo las condiciones descritas en la tabla 5 en un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 5. Condiciones del programa para la amplificación de HPVs

Paso	*Temperatura*	*Tiempo*	*Evento*
1	95°C	12 min	Desnaturalización inicial
2	95°C	1 min	Desnaturalización
3	55°C	1 min	Apareamiento
4	72°C	1 min	Extensión
5	Repetir desde el paso 2,	30 veces	
6	72°C	5 min	Extensión final