

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



"EVALUACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA Y
EPIGENETICA DEL HPV EN UNA POBLACION DEL
NORESTE DE MEXICO"

POR:

M. en C. ITZEL EVELYN CALLEJA MACIAS

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

Octubre, 2004

M. en C. ITZEL EVELYN CALLEJA MACIAS

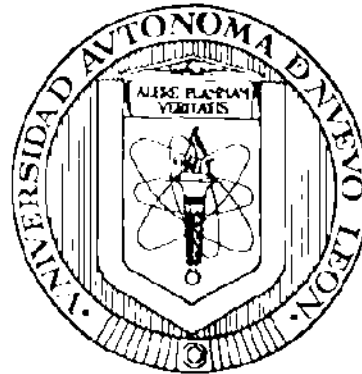
TD
RC280
J.U8
C35
2004
c.1



1080126302

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**"EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y
EPIGENÉTICA DEL HPV EN UNA POBLACIÓN DEL
NORESTE DE MÉXICO"**

POR:

M. en C. ITZEL EVELYN CALLEJA MACIAS

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

Octubre, 2004



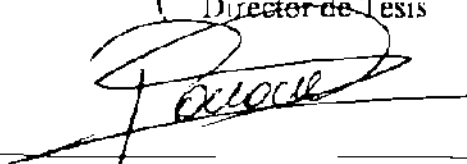
El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría interna del Dr. Hugo Barrera Saldaña, la asesoría externa del Dr. Ulrich Bernard y la co-asesoría de la Dra. Rocío Ortiz López.

EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y EPIGENÉTICA DEL HPV EN UNA POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO

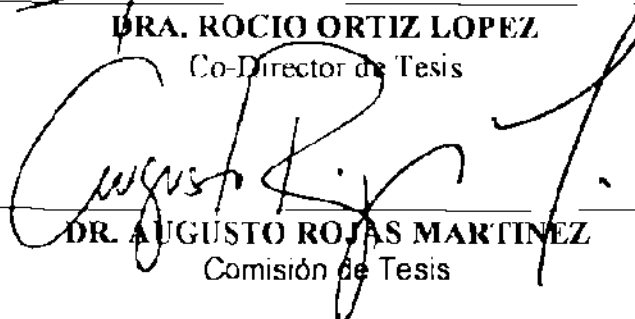
Aprobación de la Tesis:



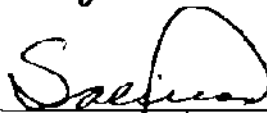
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Director de Tesis



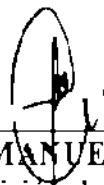
DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Co-Director de Tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Comisión de Tesis



DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA
Comisión de Tesis



DR. JUAN MANUEL ALCOCER
Comisión de Tesis



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

DEDICATORIA

A Dios

Por ser la fuerza interna que me hace seguir.

A mi familia

(Abuelita, Mama, Tía Lidia, Alberto, Wendy y Carlos, Lyrsa y Jorge)

Por todo el amor y la comprensión que siempre me han tenido. Por estar conmigo en los momentos alegres y tristes, por cuidarme y enseñarme que la vida es hermosa. Por darme todo su cariño.

A mi familia de Monterrey

(Suegros, cuñados y sobrinos)

Por apoyarme y compartir conmigo y con Mauricio esta experiencia. Por el amor y la comprensión total hacia nosotros.

A mis amigos

(Familia Arias, Olga Anguiano, Armando Ventura, Arturo y Mariana Prieto, Checo y Paola Martínez, Tony y Corina)

Por todos los momentos que reímos y disfrutamos mucho, por su valiosa y sincera amistad.

A mi gran amor.

(Mauricio Reyes)

Por tu infinita paciencia, por tu apoyo incondicional y por todo el amor que día a día me regalas.

AGRADECIMIENTOS

A los Drs. **Hugo A. Barrera** y **Uli Bernard**, directores y asesores de esta tesis, por su apoyo incondicional y sus sabios consejos y enseñanzas.

A la Drs. **Rocio Ortiz** y **Augusto Rojas** por ayuda, tiempo y colaboración de esta investigación.

A la Dra. **Herminia G. Martínez** y al **personal académico de la ULIEG**, por sus consejos y apoyo que siempre me brindaron durante todo el doctorado.

Al Dr. **Juan F. Gonzáles** y a la **Secretaria de salud del estado de Nuevo León** por su ayuda y colaboración para la realización de este sueño.

A la Dra. **Mina Kalantari** por ser mi maestra, compañera, pero ante todo mi amiga. Gracias por tu apoyo incondicional.

Al Dr. **Luis Villarreal**, por haberme aceptado en su laboratorio y permitido realizar esta tesis.

Al Dr. **Björn Hagmar**, Dra. **Anna-Lise Williamson**, Dra. **Dorothy Wiley** y el Dr. **Roberto Villarreal** por las muestras y sugerencias para la mejor realización de esta tesis.

A todas las **pacientes** que desinteresadamente contribuyeron con su material genético para que esta investigación se realizara.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** así como al **UC-Mexus**, por los apoyos al proyecto y por la beca concedida.

A todo el **personal de la ULIEG** y del **Departamento de Bioquímica** por su disponibilidad y sin fin de atenciones.

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO	PAGINA
LISTA DE TABLAS	
LISTA DE FIGURAS	
NOMENCLATURA	
RESUMEN	
I.-INTRODUCCIÓN	
1.1 El Cáncer Cervical	1
1.1.1 Historia natural y agente causal del CC.	2
1.2 Los virus del papiloma humano.	4
1.2.1 Morfología y características.	5
1.2.2 El genoma de los VPHs.	5
1.2.3 Clasificación de los VPHs.	7
1.2.4 Procesos Oncogénicos del HPV en CC y el papel de las oncoproteínas E6 y E7.	9
1.2.4.1 Regulación de los genes E6 y E7.	11
1.3 Variabilidad genómica de los VPHs como co-factor en la progresión a CC.	14
1.3.1 Variantes moleculares de los VPHs en la LCR.	16
1.4 Metilación del DNA como otro posible factor de oncogenicidad.	18

1.4.1 Represión transcripcional a través de la metilación del DNA.	19
1.4.2 Metilación del DNA y cáncer.	21
1.4.3 Metilación en los VPHs.	22
II.-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	
2.1 JUSTIFICACIÓN.	24
2.2 OBJETIVO.	24
2.2.1 Objetivo General.	24
2.2.2 Objetivos Específicos.	25
III.-ESTRATEGIA GENERAL	26
IV.-MATERIAL Y MÉTODOS	29
4.1 Área de trabajo, reactivos y equipo.	
4.1.1 Área de trabajo.	29
4.1.2 Material Biológico.	29
4.1.3 Material de plástico.	30
4.1.4 Reactivos.	30
4.1.5 Equipo.	32
4.1.6 Apoyo computacional.	33
4.2 Métodos.	35
4.2.1 Colección de muestras.	35
4.2.2 Procesamiento de la muestra.	35
4.2.3 Extracción de DNA genómico a partir de células cervicales.	36
4.2.3.1 Verificación de la calidad y la concentración del DNA.	37

4.2.3.2	Amplificación y detección del gen β -actina mediante PCR.	37
4.2.3.2.1	Verificación de la amplificación en un gel de agarosa.	38
4.2.4	Detección del virus del papiloma humano mediante PCR.	38
4.2.4.1	Detección del número de copias con ambos sistemas.	39
4.2.4.2	Detección del VPH en muestras cervicales con el sistema MY09-MY11/Gp5+-Gp6+.	39
4.2.4.3	Detección del VPH en muestras cervicales con el sistema LCR-E7/pU1R-pU2R.	40
4.2.4.4	Verificación de la amplificación en un gel de agarosa.	42
4.2.4.5	Purificación de los productos amplificados.	42
4.2.4.6	Secuenciación directa de los productos amplificados.	42
4.2.4.7	Clonación de los productos amplificados.	43
4.2.4.8	Secuenciación de los productos clonados.	44
4.2.4.9	Análisis de las secuencias y tipificación de las muestras VPH positivas.	44
4.2.5	Detección de las variantes moleculares de los VPHs 16, 18, 31 y 35.	45
4.2.5.1	Obtención de las muestras analizadas.	45
4.2.5.2	Diseño de oligos y amplificación de la LCR de los diferentes VPHs.	45
4.2.5.3	Verificación de la amplificación en un gel de agarosa.	46
4.2.5.4	Purificación de los productos amplificados.	47
4.2.5.5	Secuenciación directa de las LCR amplificadas de los diferentes VPHs.	47

4.2.5.6	Análisis de la variabilidad genómica en los VPHs.	48
4.2.5.7	Análisis filogenético de las variantes moleculares.	48
4.2.6	Determinación del estado de metilación en los HPVs.	49
4.2.6.1	Muestras testigo y controles.	49
4.2.6.2	Modificación del DNA con bisulfito de sodio.	49
4.2.6.3	Diseño de oligos y amplificación del DNA modificado.	50
4.2.6.4	Clonación y secuenciación de los productos amplificados.	51
4.2.6.5	Análisis de las secuencias y determinación del patrón de metilación.	52
4.2.6.6	Análisis estadístico.	52
4.2.7	Detección de los transcritos E6/E7 mediante la técnica NASBA.	53
4.2.7.1	Extracción de RNA a partir de muestras cervicales, amplificación y detección de las mismas	53
V.	RESULTADOS	56
5.1	Colección de las muestras.	56
5.2	Extracción y cuantificación del DNA.	58
5.3	Verificación de la calidad del DNA.	58
5.3.1	Amplificación y detección del gen β -actina.	58
5.4	Detección del virus del papiloma humano.	59
5.4.1	Detección del número de copias.	59
5.4.2	Detección y tipificación de los VPHs.	60
5.5	Detección de las variantes moleculares de los VPHs 16, 18, 31 y 35.	63

5.5.1	Diseño de oligonucleótidos y estandarización.	63
5.5.2	Detección de las variantes moleculares del VPH-16.	64
5.5.3	Detección de las variantes VPH-18.	65
5.5.4	Detección de las variantes del VPH-31.	66
5.5.5	Detección de las variantes del VPH-35.	69
5.6	Determinación del patrón de metilación en muestras normales (NIL), NICs y con cáncer.	71
5.6.1	Diseño del estudio.	71
5.6.2	Determinación de los patrones heterogéneos de metilación del DNA en los genomas del VPH-16 de la línea celular CaSki.	74
5.6.3	Diferentes CpGs son alterados con diversas frecuencias.	76
5.6.4	Correlación entre los patrones de metilación del DNA de los CpGs con la patología de la población celular infectada.	79
5.6.5	Los dinucleótidos meCpA y meCpT identifican metilación de <i>ново</i> en el DNA del VPH-16 en epitelio cervical.	82
5.7	Amplificación y detección de los transcritos E6/E7 en muestras metiladas y no metiladas.	86
VI.	-DISCUSIÓN	89
VII.	-CONCLUSIONES	102
VIII.	-BIBLIOGRAFÍA	104
IX.	-RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO	115

LISTA DE FIGURAS

	Pagina
Figura 1. Organización circular del genoma del VPH 16.	6
Figura 2. Organización genómica lineal del VPH 16.	7
Figura 3. Funciones de las oncoproteínas virales y su interacción con proteínas celulares.	11
Figura 4. El ciclo de vida del VPH.	12
Figura 5. Mapa de la región larga de control de los VPHs.	14
Figura 6. Distribución geográfica de las variantes del VPH 16 en el mundo.	17
Figura 7. Mecanismos propuestos para explicar la supresión de la transcripción por la metilación del DNA.	20
Figura 8. Modelos de los diferentes mecanismos a través de los cuales la metilación del DNA lleva a la oncogénesis.	22
Figura 9. Estrategia experimental general.	28
Figura 10. Representación esquemática de la reacción de Nasba	55
Figura 11. Mapa de la ciudad de Monterrey mostrando el área geográfica dentro de la cual las muestras fueron tomadas.	57
Figura 12. DNA genómico resuelto en gel de agarosa al 0.8%.	58
Figura 13. Gel de agarosa al 2% mostrando la amplificación del gen β -actina	59
Figura 14. Detección del número de copias con el sistema MY09/MY11.	60
Figura 15. Proceso de detección y tipificación de los VPHs.	61

Figura 16.	Geles de agarosa mostrando la amplificación de las variantes moleculares del VPH 16, 18, 31, 35.	64
Figura 17.	Prevalencia de las variantes del VPH 16 y 18 en las muestras mexicanas.	66
Figura 18.	Variación genómica de los asilados del VPH 31 de México, Noruega, Sudáfrica y los EUA en un segmento genómico de 523 pb, la mitad del extremo 3' la LCR viral.	67
Figura 19.	Árbol filogenético de las variantes del VPH-35 de México, Noruega, Sudáfrica y los EUA.	68
Figura 20.	Variación genómica de los aislados VPH-35.	70
Figura 21.	Árbol filogenético de las variantes del VPH-35 de México, Noruega, Sudáfrica y los EUA.	70
Figura 22.	Cromatogramas mostrando CpGs metilados y no metilados.	72
Figura 23.	Heterogeneidad de la metilación de los CpGs en los genomas del VPH-16 derivados de células CaSki.	75
Figura 24.	Heterogeneidad de la metilación de los CpG en los genomas del VPH-16 derivados de especímenes clínicos.	77
Figura 25	Las frecuencias de metilación de los 19 nucleótidos CpG en los genomas del VPH-16.	79
Figura 26	Las frecuencias de metilación de los 19 dinucleótidos CpGs en los genomas del VPH-16 de cinco clonas independientes derivadas de las 115 muestras clínicas separadas por patología.	81
Figura 27	Cromatogramas mostrando la metilación en los dinucleótidos CpAs y CpTs.	84
Figura 28	Metilación de las CpAs y CpTs en las 115 muestras analizadas.	85
Figura 29	Amplificación de VPH 16 usando NASBA en la línea celular SiHa.	86
Figura 30	Proporción de los transcritos E6/E7 en muestras asintomáticas y con cáncer.	87

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Tipos de HPVs encontrados y su asociación con enfermedad.	8
Tabla 2 Datos de los oligos utilizados para la detección de las variantes moleculares.	46
Tabla 3 Características de la población estudiada.	57
Tabla 4 Prevalencia de los tipos detectados en la población del área metropolitana de Monterrey, N.L.	62
Tabla 5 Variantes moleculares del VPH 18.	66
Tabla 6 Resultado del análisis con NASBA en las muestras estudiadas.	88

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Variante asiático-americana
Af	Variante africana
As	Variante asiática
C	Citosina
CC	Cáncer cervical
CE	Región potenciadora
cols.	Colaboradores
CpG	Dinucleótido CG
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	Ácido desoxirribonucleico complementario
DNMT	Enzimas metiltransferasa
dNTPs	Trifosfatos de desoxinucleósidos
E	Variante europea
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
EPE	Edad del primer embarazo
EPM	Edad de la primera menstruación
EUA	Estados unidos americanos
fg	Fentogramos
fig.	Figura
HCl	Ácido clorhídrico
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HPV	Papilomavirus humanos
h	Hora
hrs	Horas
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio

LCR	Región larga de control
M	Molar
MBD	Dominio de unión a grupos metilo
meCpG	Dinucleótido CG metilado
mg	Miligramos
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MX	México
NA	Variantes norteamericanas
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NCS	Número de compañeros sexuales
ng	Nanogramos
NIC	Neoplasia intraepitelial cervical
NIL	lesiones no identificables
NW	Noruega
ORF	Cuadros de lectura abiertos
°C	Grados centígrados
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pm	Promotor temprano
pMol	Picomolar
RE2	Región promotora
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
s	segundos
SA	Sudáfrica
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T	Timina

Taq	DNA polimerasa de <u>Thermophilus aquaticus</u>
V	Voltios
X	Veces la concentración
μg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar
US	Estados unidos

RESUMEN

Itzel Evelyn Calleja Macías
Fecha de graduación: Octubre, 2004
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Título del Estudio: EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y EPIGENÉTICA DEL HPV EN UNA POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO.

Número de páginas: 115

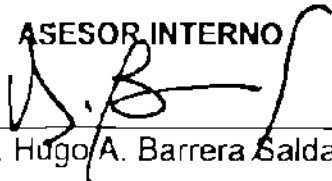
Candidata para el grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Área de estudio: Medicina Molecular

Propósito y Método de estudio: Los papilomavirus humanos (HPVs) desempeñan un papel central en la etiología del cáncer cervical, un importante problema de salud pública en México. Solamente una pequeña fracción de lesiones intraepiteliales cervicales (NICs) infectadas con HPVs progresan a cáncer, indicando que existen otros factores implicados en el desarrollo de la neoplasia. Dos factores importantes que han emergido son la variación genómica en la secuencia de los HPVs y la metilación del DNA viral. En este trabajo se analizaron 1282 muestras cervicales, a las cuales les fue extraído el DNA genómico. En ellas se detectó y tipificó mediante PCR y secuenciación el HPV. A partir de las muestras HPV positivas, se analizaron las secuencias genómicas de las variantes mexicanas de los tipos de HPV-16, 18, 31 y 35, mediante PCR y secuenciación nucleotídica directa. Los patrones de metilación de 19 CpGs de la región larga de control (LCR) y de una parte del gen L1 en el genoma del HPV-16, se establecieron mediante la conversión con bisulfito de sodio, clonación y secuenciación.

Contribuciones y Conclusiones: Se detectó la presencia del HPV en un 25% de las muestras. Entre 112 de las muestras positivas para el HPV-16, se detectaron 14 variantes europeas y 98 a variantes asiático-americanas. De 15 muestras positivas para HPV-18, 13 resultaron europeas y 2 africanas. Se construyeron árboles filogenéticos de las variantes del HPV-31 y del 35. Estos se construyeron con 46 aislados de HPV-31 de México, Europa, África y de los Estados Unidos que mostraron 35 cambios nucleotídicos en una región de 428 pb. Las variantes de este tipo formaron dos ramas: una al parecer europea y la otra Africo-americana. El análisis de las variantes del HPV-35 se realizó con aislados de México, Europa, África y de los EUA. Estos tuvieron 11 cambios nucleotídicos, incluyendo una inserción/delección de 16 pb característica; estas variantes formaron varios grupos filogenéticos. La variante del HPV-35 típica de los indios americanos no fue detectada. Se analizó el patrón de metilación de 115 muestras clínicas HPV-16. Se observaron heterogeneidades importantes entre clonas de diferentes muestras, así como también entre clonas derivadas de muestras individuales. La frecuencia de la metilación de los CpGs fue del 14.5% y de 0.21 y 0.23%, para los sitios CpA y CpT (indicadores de metilación de novo), respectivamente. Un sitio CpG localizado en la unión entre los dos nucleosomas ubicados entre el potenciador y el promotor del HPV-16 mostró una metilación mínima (3%). La metilación en la mayoría de los sitios fue más alta en cáncer y más baja en las NICs. La información generada en este estudio aporta datos importantes sobre el comportamiento de este virus, los cuales pueden ser relevantes para la progresión a la carcinogénesis.

ASESOR INTERNO



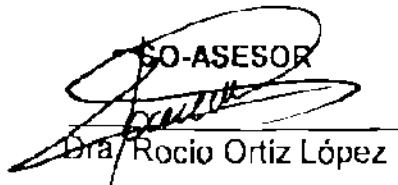
Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

ASESOR EXTERNO



Dr. Hans-Ulrich Bernard

CO-ASESOR



Dra. Rocio Ortiz López