

ramas filogenéticas de las variantes del VPH-16, dos de ellas conocidas como las ramas africanas (Af1 y Af2), una rama europea (E) cercanamente relacionada a la rama asiática (As), y un rama con las variantes comunes en indios americanos, que también se encuentran en ciertas partes de Asia (AA), las cuales están cercanamente relacionadas a las variantes específicas de los indios norteamericanos (NA). Las variantes E son caracterizadas por la clona de referencia original del VPH-16, obtenida de una paciente alemana, y una variante difiriendo en el fragmento genómico de diagnóstico (posición genómica 7450-7850) en una sola posición, 7521. Las variantes AA son caracterizadas por mutaciones en las posiciones 7485, 7489, 7507, 7669, 7689, 7729, 7743, 7764 y 7786. Estas posiciones genómicas refieren a la secuencia revisada de VPH-16. Es decir, la posición 7521 en la secuencia revisada del VPH 16 (VPH 16R) es idéntica a la posición 7519 en la clasificación filogenética original;¹³⁶ lo mismo sucede con las otras mutaciones (7483, 7487, 7505, 7667, 7687, 7727, 7741, 7762, y 7784). En este estudio se detectaron en estas muestras de 112 mujeres mexicanas positivas para VPH-16, que 98 pertenecen a las variantes AA y 14 a las variantes E (fig. 17).

5.5.3 Detección de las variantes VPH-18. La clona de referencia del VPH-18 pertenece a un aislado brasileño y probablemente es la representante de las variantes indígenas americanos del VPH-18. La LCR de las variantes europeas difiere de esta clona por mutaciones en las posiciones 7529, 7567, 7592, y 7670, y las variantes africanas difieren por 10 cambios nucleotídicos adicionales en un segmento de 320 pb¹³³ (ver tabla 5)

Tabla 5. Variantes moleculares del VPH 18

	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
	4	4	4	5	5	5	5	5	5	6	6	5	5	6	6	6	
	6	8	9	1	2	3	3	6	6	9	4	5	5	7	0	2	3
	9	6	6	2	9	0	1	3	7	2	3	1	8	0	4	6	0
Referencia	T	C	C	G	C	T	T	G	A	T	T	T	A	A	T	C	C
MX854			G	A		C		A	C	C	G	C	C	T	C	T	A
MX978					A		G		C	C				T			
MX690	G				A				C	C				T			
MX1035			G	A		C		A	C	C	G	C	C	T	C	T	
MX87					A				C	C				T			
MX887		T			A				C	C				T			
MX1249					A		G		C	C				T			
MX1234		T			A				C	C				T			

Aquí, entre 15 aislados mexicanos positivos para VPH 18, se encontraron que 13 pertenecían a la rama europea y 2 a las variantes africanas (fig. 17).

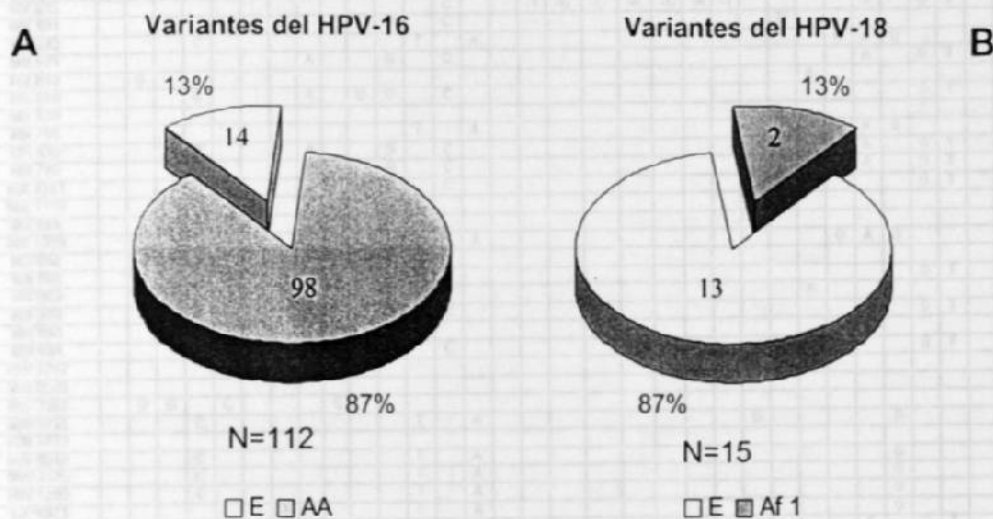


Figura 17. Prevalencia de las variantes del VPH 16 y 18 en las muestras mexicanas. De entre las muestras positivas para VPH 16 (A), se detectaron variantes E (13%) y AA (87%), mientras que de entre las muestras positivas para VPH 18 (B), se observaron variantes E (87%) y Af1 (13%).

5.5.4 Detección de las variantes del VPH-31. Veintinueve muestras fueron VPH-31 positivas, el segundo tipo de VPH más común en la cohorte de Monterrey. La diversidad genómica de los aislados del VPH-31 nunca había sido estudiada. Por lo tanto, se amplificó y secuenció de estas muestras un segmento de 523 pb entre las posiciones genómicas 7527 -137, el cual incluye la parte homóloga del potenciador viral del segmento de diagnóstico de 400 pb

otro rama no tenía ninguna muestra europea, pero sí cuatro de los seis aislados sudafricanos. Esta distribución asimétrica sugiere que las variantes Europeas se originaron de la primera rama original, mientras que la segunda de una variante africana. La primera y segunda rama contenían 13 y 16 muestras mexicanas y 1 y 2 muestras de los Estados Unidos, respectivamente (fig. 19).

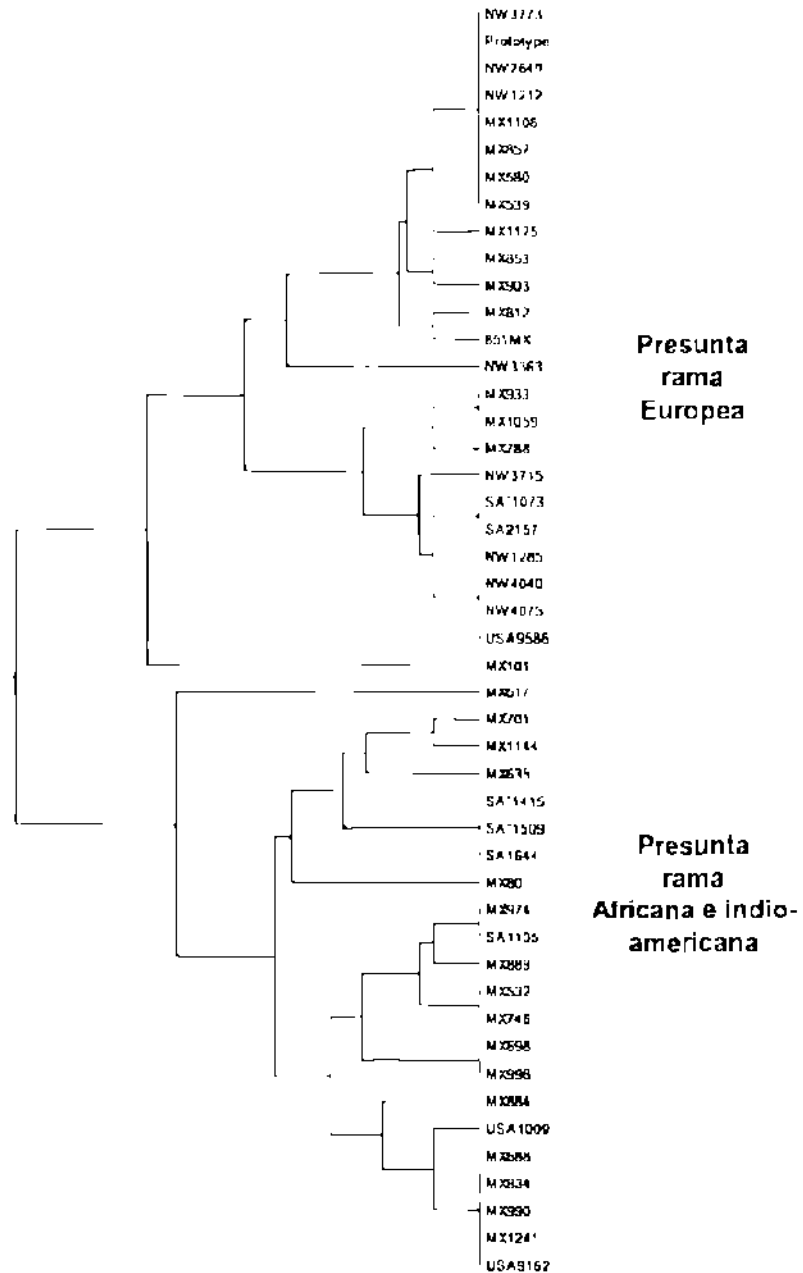


Figura 19. Árbol filogenético de las variantes del VPH 31 de México, Noruega, Sudáfrica y los EUA. La nomenclatura es como se describe en la leyenda de la figura 18.

5.5.5 Detección de las variantes del VPH-35. El tipo VPH-35 fue, con siete muestras, el cuarto tipo más común en esta cohorte. La clona original del VPH-35 fue aislada en los Estados Unidos, y la etnicidad del paciente es desconocida. La secuencia correcta de este aislado VPH-35 ha sido publicada bajo abreviatura de VPH-35h (véase http://hvp-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/-compendium/htdocs/HTML_FILES/HPVcompintro4.html#comp94),¹³⁴ para distinguirla de una secuencia publicada anteriormente, la cual contiene una gran cantidad de errores nucleotídicos. Puesto que solamente una sola secuencia adicional de este genoma ha sido divulgada,¹³⁵ comparamos los aislados mexicanos VPH-35 con cinco muestras europeas, diez africanas y cinco de los EUA. Para esta comparación, se amplificó un segmento genómico de 893 pb entre las posiciones 7146 y 187, y se detectó, además del prototipo, ocho variantes con un total de 10 cambios nucleotídicos y de una inserción de 16 pb (ver figura 20). Las distancias máximas entre cualquier de estas dos variantes fueron cinco mutaciones (0.6%). Estas variantes del VPH-35 formaron varios grupos o ramas de variantes más que 2 o 3 ramas filogenéticas como las del VPH-16, 18, y 31 (ver figura 21). Todas las muestras mexicanas y noruegas y tres de las cinco muestras de los EUA tenían una inserción de 16 pb característica y diferían en y entre las dos cohortes geográficas por una sola mutación puntual. La ausencia de la inserción 16 pb fue específica para la clona de referencia y algunos de los aislados sudafricanos. Encontramos otro aislado igual al de la clona de referencia una segunda vez en los EUA, así como otra variante sin la inserción.

Referencia	Posición en el genoma																											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Referencia	A	T	T	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NW 3441																												
NW 3793																												
NW 1301																												
NW 1215																												
NW 2760																												
MX 378																												
MX 963																												
MX 1150																												
MX 372																												
MX 1159																												
MX 557																												
MX 1031																												
SA 1129																												
SA 1221																												
SA 1230																												
SA 1944																												
SA 1505																												
SA 1744																												
SA 1791																												
SA 1807																												
SA 1954																												
SA 2299																												
USA 4492																												
USA 4117																												
USA 6330																												
USA 3057																												
USA 14																												

Figura 20. Variación genómica de los aislados VPH-35. La figura muestra las diferentes mutaciones detectadas en un segmento genómico de 893 pb, región que corresponde a la mitad del extremo 3' de la LCR viral. En la parte superior se observa la posición genómica en donde las mutaciones fueron detectadas.

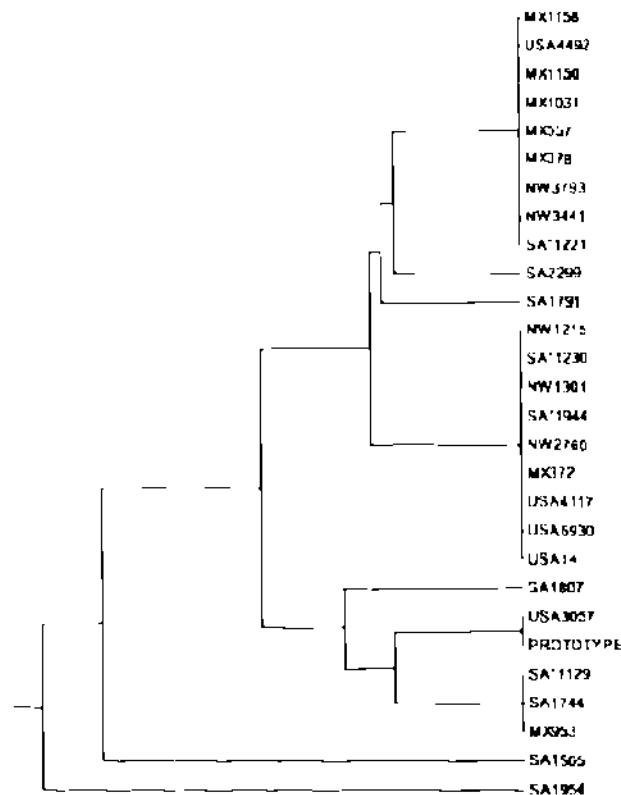


Figura 21. Árbol filogenético de las variantes del VPH-35 de México, Noruega, Sudáfrica y los EUA. La nomenclatura es como se describe en la leyenda de la figura 18.

5.6 Determinación del patrón de metilación en muestras normales (NIL), NICs y con cáncer.

5.6.1 Diseño del estudio. Este estudio se llevó a cabo con la intención de expandir investigaciones previas sobre la metilación de los CpGs del DNA del VPH-16, del grupo de nuestro colaborador, el Dr. Hans Ulrich Bernard. Tales investigaciones se basaron en la modificación del DNA con bisulfito a partir de líneas celulares y de muestras clínicas, las cuales fueron después amplificadas con oligonucleótidos específicos para el DNA, en los cuales los residuos de citosina habían sido convertidos a grupos uracilos, seguidas por una secuenciación directa del producto amplificado¹²⁶. Al principio de este nuevo estudio, se observó (datos no mostrados) que las reacciones de secuenciación con frecuencia mostraban señales C y T traslapadas, las cuales no podían ser eliminadas cambiando la temperatura o la duración del tiempo de la reacción con bisulfito. Se concluyó que las poblaciones celulares de la misma fuente contenían mezclas de genomas de VPH-16 con CpGs o meCpGs en la misma posición. Por lo tanto, se modificó este protocolo, recurriendo a clonar los amplicones en plásmidos en *E. coli* y a seleccionar aleatoriamente para secuenciar a cinco colonias independientes de cada muestra (ver figura 22). Esto se llevó a cabo con el fin de identificar genomas del VPH-16 metilados heterogéneamente, asumiendo que pudiera haber cantidades similares de moléculas metiladas y no metiladas. Se reconoce que es imposible analizar mezclas de moléculas metiladas y no metiladas en muestras donde un tipo de DNA excede en número sumamente al otro.

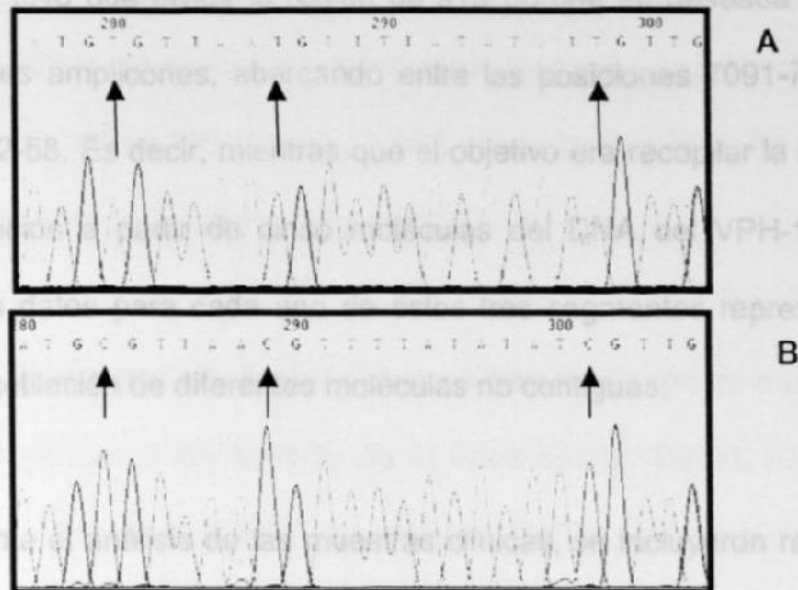


Figura 22. Cromatogramas mostrando CpGs metilados y no metilados. A) Secuencia no metilada. Las flechas muestran a las citosinas convertidas en timinas debido a que no estaban metiladas; B) Secuencia metilada. Las flechas indican a las citosinas metiladas.

Se decidió estandarizar el análisis amplificando y secuenciando un segmento genómico entre las posiciones 7079 y 85, que incluyen 19 CpGs. Tres de estos 19 CpGs fueron derivados del extremo 3' del gen L1 (7091, 7136, y 7145), cinco del segmento 5' de la LCR (7270 a 7461, la cual hace contribuciones aún sin entender al proceso transcripcional), seis del potenciador transcripcional (7535 a 7862) y cinco del promotor de E6 (31-58). Se seleccionó este segmento con el fin de detectar posibles correlaciones de los blancos de la metilación con las unidades funcionales conocidas del genoma del VPH-16. Es bien sabido que la modificación con bisulfito no solamente altera los residuos de citosina, sino que introduce rupturas en el DNA. Por consiguiente, es imposible amplificar mediante PCR con eficiencia alta regiones de DNA de tamaños que excedan algunos cientos de pares de bases. Debido a esta

limitante, se tuvo que dividir la región de 913 pb que se deseaba analizar en tres diferentes amplicones, abarcando entre las posiciones 7091-7461, 7535-7695, y 7862-58. Es decir, mientras que el objetivo era recopilar la información de la metilación a partir de cinco moléculas del DNA del VPH-16 de cada muestra, los datos para cada uno de estos tres segmentos representaban el estado de metilación de diferentes moléculas no contiguas.

Durante el análisis de las muestras clínicas, se incluyeron regularmente como controles negativos y positivos DNA de las células de SiHa y CaSki. El único genoma del VPH-16 en SiHa no tiene ningún meCpGs a través de la región potenciadora-promotora. Descubrimientos previamente publicados basados en la secuenciación directa del producto amplificado mostraron que la mayoría de los 500 genomas endógenos del VPH-16 en las células CaSki parecían estar completamente metilados en toda esta región¹²⁶.

Con el fin de estandarizar el análisis de las muestras clínicas en este estudio, se analizaron cinco clonas de cada uno de los segmentos del VPH-16 modificados con bisulfito, y amplificados mediante PCR: 51 infecciones asintomáticas (NIL); 17 neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) de alto y bajo grado; y 47 de los cánceres cervicales para cada una de las 19 CpGs en el segmento L1-LCR descrito arriba. Esta estrategia apuntó hacia dar información sobre un total de 10,925 CpGs. Desafortunadamente, algunas de las muestras no tenían suficiente DNA para completar este estudio, y en estos casos (51 de 115 muestras) se tuvo que eliminar el análisis del segmento L1 y del extremo 5'

de la LCR. Como resultado, este estudio reporta el estado de metilación de solamente 8,885 residuos de CpG: 6,080 representan información acerca de los 19 residuos de CpG en 320 clonas, y 2,805 el estado de metilación de 11 CpGs en 255 clonas del potenciador y del promotor.

5.6.2 Determinación de los patrones heterogéneos de metilación del DNA en los genomas del VPH-16 de la línea celular CaSki. En un estudio previo¹²⁶ del DNA del VPH-16 en células CaSki, los amplicones fueron secuenciados directamente después de la modificación con bisulfito y de la amplificación por PCR, y los datos obtenidos con esta estrategia sugirieron que todos los CpGs que se traslapaban con el potenciador y el promotor (posiciones 7535 a 58) estaban completamente metilados en la mayoría de las copias virales¹²⁶. Aquí se reportó un reanálisis basado en secuencias de clonas individuales de DNA modificado y amplificado por PCR, en el cual también se amplió el segmento analizado en la dirección 5'. En contraste con los datos publicados, la figura 23 muestra que ninguna de las 15 clonas estaba completamente metilada, sino que cada copia contenía entre una y cinco (de las 19) CpGs no metiladas. Ninguna de las cinco clonas estaba metilada en la posición 7270 (la cual no había sido analizada previamente), y la metilación se detectó infrecuente en las posiciones 7535, 7554 y 7862. En base a estos resultados, se concluyó que los 500 genomas del VPH-16 en las células CaSki no están homogéneamente metilados, pero que hay diferencias, ya sea entre copias intracromosomales repetidas en tandem, o entre copias insertadas en diversas localizaciones cromosomales¹⁴⁰. Por lo que se re-examinó esta

propuesta mediante la secuenciación directa de los productos modificados con bisulfito y amplificados por PCR a partir de varios análisis independientes del DNA de CaSki, según lo hecho por Badal y cols.¹²⁶ En estos experimentos se observó que en todas las lecturas de la secuencia picos de C y de T se traslapaban en las posiciones 7270, 7535, 7554, y 7862, con el pico de C excediendo levemente al pico de T. Esto confirma la metilación heterogénea de las moléculas del VPH-16 en CaSki y la selección fortuita de un exceso de moléculas no metiladas en la figura 23.

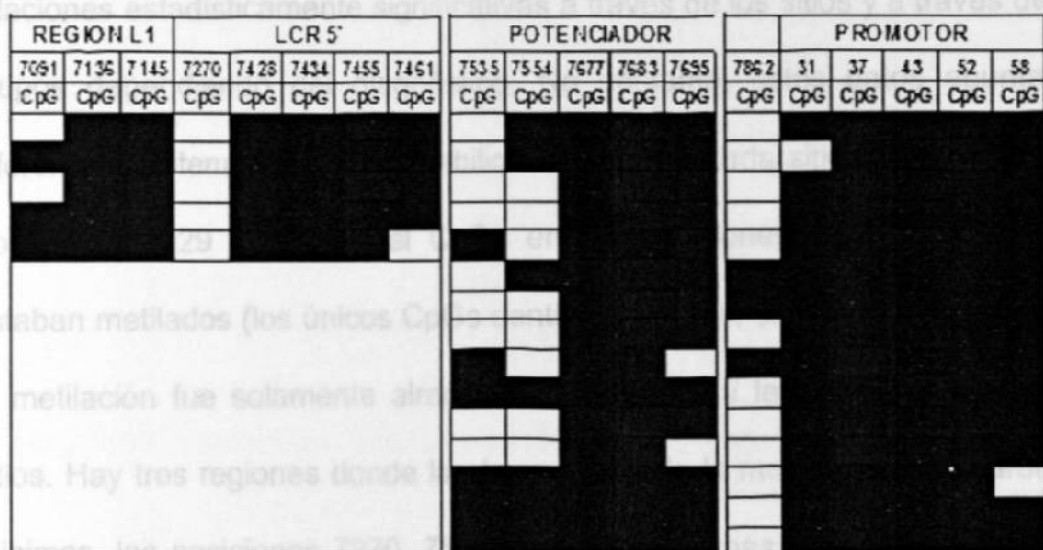
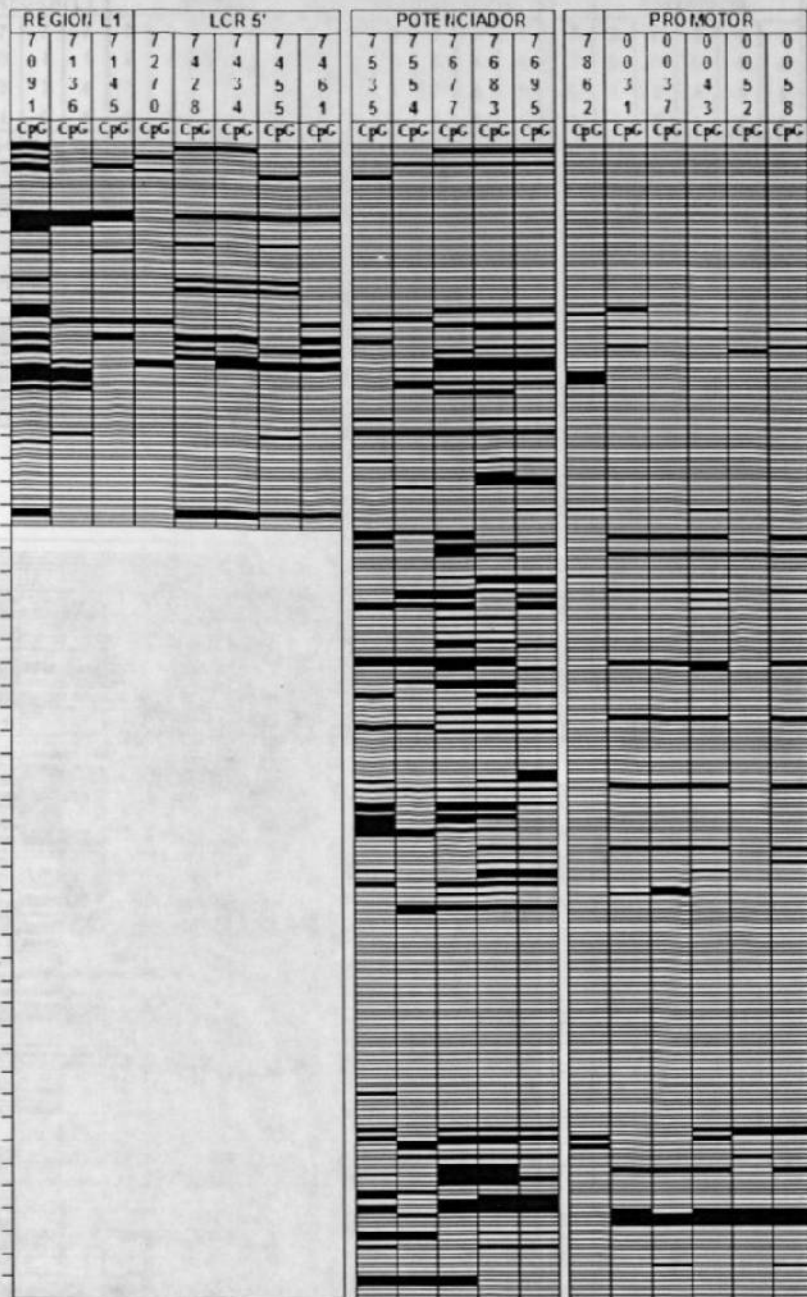


Figura 23. Heterogeneidad de la metilación de los CpGs en los genomas del VPH-16 derivados de células CaSki. Cada uno de los rectángulos verticales representa uno de 19 dinucleótidos específicos para cada CpG, el número que se encuentra en la parte superior representa la posición de este CpG en el genoma del VPH-16. Los rectángulos horizontales superiores representan al segmento de 913 pb del genoma del VPH-16, cubriendo el extremo 3' del gen L1 y la zona completa de la LCR. Las CpGs no metiladas son indicadas por los rectángulos blancos y la metilada por los negros. Los dos separadores blancos verticales indican los límites entre los amplicones, y las discontinuidades entre las moléculas del VPH-16 supuestamente diferentes.

5.6.3 Diferentes CpGs son alterados con diversas frecuencias. La figura 24 representa la metilación o la falta de metilación para cada uno de los 8,885 sitios CpG evaluados en este estudio. En conjunto, se encontraron 1,292 CpGs metilados, es decir 14.5% de todos los CpGs estaban metilados. Aproximadamente, la mitad (51 de 115) de los especímenes no pudieron ser amplificados entre la región 7091 y 7461. Por lo tanto, para esta región, el tamaño reducido de la muestra pudo haber limitado el poder de detectar relaciones estadísticamente significativas a través de los sitios y a través de los grupos dependiendo del diagnóstico. No obstante, estos datos apuntan a diferencias sistemáticas de probabilidades de que cada sitio pueda metilarse. Por ejemplo, 29 del 41% del CpGs en las posiciones 7091, 7136 y 7145 estaban metilados (los únicos CpGs dentro de un gen, el gen L1), mientras que la metilación fue solamente alrededor del 10% para la mayoría de los otros sitios. Hay tres regiones donde las frecuencias de la metilación alcanzaron los mínimos, las posiciones 7270, 7554, y de manera más pronunciada, con una frecuencia de solamente un 3%, la posición 7862. Notablemente, estas tres regiones coinciden con las mismas tres posiciones no metiladas detectadas en la LCR de los genomas del VPH-16 en las células CaSki.



A

Figura 24. Heterogeneidad de la metilación de los CpG en los genomas del VPH-16 derivados de especímenes clínicos. La figura muestra la metilación de los 19 dinucleótidos CpGs en los genomas del VPH-16 de cinco clones independientes derivados de cada una de las 115 muestras clínicas, una base de datos del estado de metilación de 8,885 dinucleótidos CpGs. A: pacientes asintomáticas; B: NICs; C: cáncer cervical. Los rectángulos horizontales blancos representan las CpGs no metiladas, mientras que los rectángulos negros las CpG metiladas. Las líneas horizontales de cada quintuple representan las clones derivadas de cada paciente. La línea horizontal no indica un amplicón continuo de 913 pb, pero es derivado de 3 diferentes genomas de VPH-16, como lo indican las barras verticales blancas. Los espacios grandes blancos en esta figura indican clones que fueron parcialmente analizadas debido a la pequeña cantidad de DNA. Debido a la compresión de la figura, las muestras mexicanas, noruegas y de los EUA, no pueden ser visualizadas.

distinción clara y de estas cohortes y las variantes.

"Evaluación de la variabilidad genética y epigenética del HPV en el NE de México"

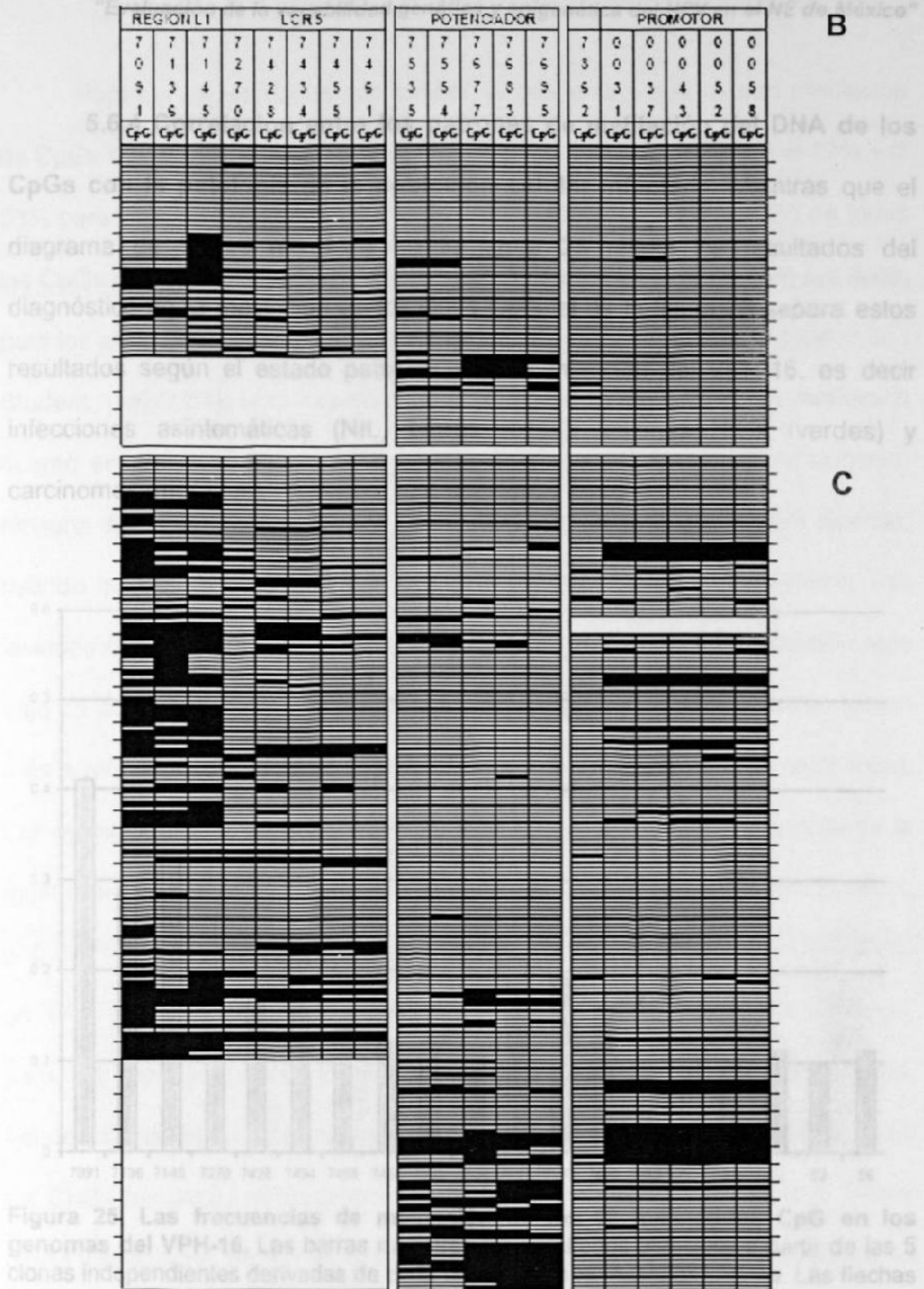


Figura 24. Heterogeneidad de la metilación de los CpG en los genomas del VPH-16 derivados de especímenes clínicos. La cohorte mexicana tenía un 70% de las variantes genómicas AA y solo el 30% de las variantes E, mientras que todas la muestras noruegas y de los EUA eran variantes E. No se pudo detectar ninguna distinción obvia entre los patrones de la metilación de estas cohortes y las variantes.

Para los especímenes con cáncer, la proporción que mostró metilación de CpGs fue del 4% en la posición 7862 y estuvo en un rango entre el 12% y el 53% para el resto de los sitios CpGs (barras moradas). La proporción de todas las CpGs que estaban metiladas fue significativamente mayor de cero (es decir, diagnóstico de la metilación en los sitios CpG, el de la figura 26 separa estos para los sitios CpGs localizados entre 7091-7695 y 31-58; usando la prueba de t Student, $p < 0.0001$). Una excepción fue la posición 7862, donde la metilación infecciones asintomáticas (NIL, barras rosas), lesiones NICs (verdes) y ocurrió entre 2 y el 4% de los especímenes examinados, y no se encontró carcinomas (morados).

ninguna diferencia entre NICs y NILs, ni entre los cánceres y NILs (por ejemplo, usando prueba exacta de Fisher, $p=1.0$ y $p=3.6$, respectivamente). Las

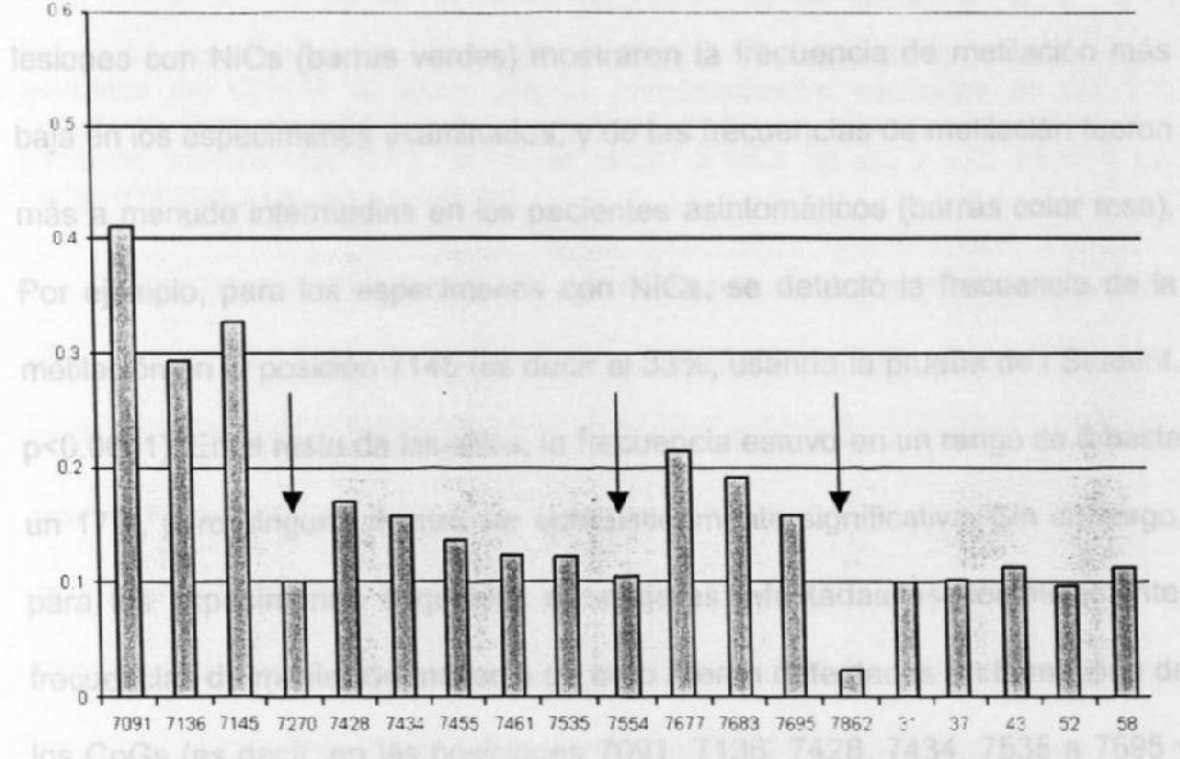


Figura 25. Las frecuencias de metilación de los 19 nucleótidos CpG en los genomas del VPH-16. Las barras muestran los resultados obtenidos a partir de las 5 clonas independientes derivadas de cada una de las 115 muestras clínicas. Las flechas indican los tres sitios en donde se detectó menor metilación.

Para los especímenes con cáncer, la proporción que mostró metilación de CpGs fue del 4% en la posición 7862 y estuvo en un rango entre el 12% y el 53% para el resto de los sitios CpGs (barras moradas). La proporción de todas las CpGs que estaban metiladas fue significativamente mayor de cero (es decir, para los sitios CpGs localizados entre 7091-7695 y 31-58; usando la prueba de t Student, $p < 0.0001$). Una excepción fue la posición 7862, donde la metilación ocurrió entre 2 y el 4% de los especímenes examinados, y no se encontró ninguna diferencia entre NICs y NILs, ni entre los cánceres y NILs (por ejemplo, usando prueba exacta de Fischer, $p=1.0$ y $p=0.6$, respectivamente). Las lesiones con NICs (barras verdes) mostraron la frecuencia de metilación más baja en los especímenes examinados, y de las frecuencias de metilación fueron más a menudo intermedias en los pacientes asintomáticos (barras color rosa). Por ejemplo, para los especímenes con NICs, se detectó la frecuencia de la metilación en la posición 7145 (es decir el 33%, usando la prueba de t Student, $p < 0.0001$). En el resto de los sitios, la frecuencia estuvo en un rango de 0 hasta un 17%, pero ninguna mostró ser estadísticamente significativa. Sin embargo, para los especímenes adquiridos de mujeres infectadas asintóticamente, frecuencias de metilación mayores de cero fueron detectadas en la mayoría de los CpGs (es decir, en las posiciones 7091, 7136, 7428, 7434, 7535 a 7695 y 31-43 y la posición 58, en un rango del 6% en 37 a un 33% en 7091, usando las prueba de t Student, $p < 0.0001$).

"Evaluación de la variabilidad genética y epigenética del HPV en el NE de México"

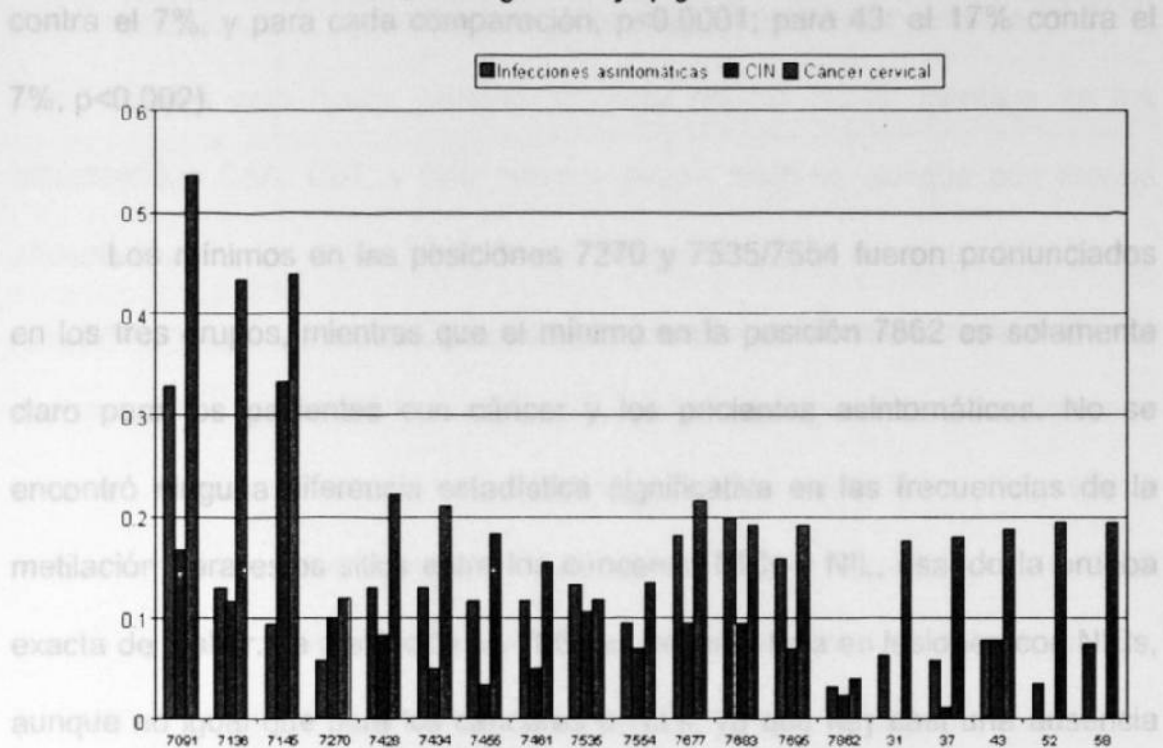


Figura 26. Las frecuencias de metilación de los 19 dinucleótidos CpGs en los genomas del VPH-16 de cinco clonas independientes derivadas de las 115 muestras clínicas separadas por patología. Las barras color rosa muestran a los pacientes asintomáticos (NIL); las barras verdes a NICs de alto y bajo grado; y las barras moradas a cánceres cervicales.

Para los cánceres, el 42% de especímenes mostraron metilación en los sitios CpG 7136 y 7145. En comparación, sólo el 13% y el 9% de sitios en 7136 y 7145 estuvieron metilados en especímenes de mujeres infectadas asintomáticamente (es decir, para cada comparación, se usó la prueba exacta de Fisher, $p < 0.00002$). Además, en el sitio 7145, el 33% de especímenes con NICs mostraron metilación en comparación con el 9% de los especímenes de las mujeres con NIL (de manera similar, $p = 0.0005$). Finalmente, cuando se compararon los especímenes de mujeres con NIL, la metilación en muestras con cáncer fue significativamente elevada en las posiciones 31, 37, 52 y 58 (usando la prueba exacta de Fisher, para 31: el 17% contra el 6%, $p < 0.0004$; para 37: el 17% contra el 6%; para 52: el 18% contra el 4%; y para 58: el 18%

contra el 7%, y para cada comparación, $p < 0.0001$; para 43: el 17% contra el 7%, $p < 0.002$).

Los mínimos en las posiciones 7270 y 7535/7554 fueron pronunciados en los tres grupos, mientras que el mínimo en la posición 7862 es solamente claro para los pacientes con cáncer y los pacientes asintomáticos. No se encontró ninguna diferencia estadística significativa en las frecuencias de la metilación para estos sitios entre los cánceres, NICs y NIL, usando la prueba exacta de Fisher. La metilación en 7862 es también baja en lesiones con NICs, aunque no igual que para los cánceres o NILs, ya que hay casi una ausencia completa de la metilación observada en todas las posiciones del extremo 3' del promotor y no se detectó una frecuencia estadísticamente mayor de metilación en este sitio cuando se realizó la comparación con los otros grupos. Por lo tanto, en casi todas las posiciones, la metilación es mayor en lesiones con cáncer (barras moradas) y menor entre las lesiones con NICs (barras verdes).

5.6.5 Los dinucleótidos meCpA y meCpT identifican metilación de novo en el DNA del VPH-16 en epitelio cervical. En el estado metilado de las secuencias palindrómicas, los residuos de citosina CpG de la hebra superior e inferior están, por lo general, metilados. Los dos productos de replicación del DNA que contiene meCpG están hemimetilados, y la metilación de citosinas no metiladas es restaurada por el mantenimiento de la DNA metilasa *DNMT1*. Las *DNMT3a* y *DNMT3b* son consideradas metilasas de *novo* y su blanco son los residuos de citosina no metilados, mientras que las contribuciones al

mantenimiento de la metilación han sido demostrado recientemente.^{141,142,143} Mientras que esto ocurre preferencialmente en los CpGs, cambios en los dinucleótidos CpA, CpT, y CpC pueden ocurrir también, aunque con menos eficacia que en los CpGs.^{142,144} Sin embargo, el estado de metilación de los meCpAs, meCpTs, y los meCpCs no son mantenidos durante la replicación, ya que uno de los productos de la replicación no lleva el registro de la metilación, y la otra hebra se diluye tras múltiples rondas de replicación. Como consecuencia, la detección de los residuos de meCpA, de meCpT y de meCpC prueba que la molécula de DNA secuenciada o uno de sus precursores inmediatos ha sido metilado, y no constituye un registro de un mantenimiento a largo plazo de metilación. Un registro de estos tres dinucleótidos metilados en los genomas del VPH-16 por lo tanto significa una documentación de una metilación de novo activa en las poblaciones celulares que llevan estos genomas del VPH-16.

Con la finalidad de medir la metilación de CpA, CpT y de CpC, se investigó la misma secuencia nucleotídica de todas las 115 muestras en las cinco clonas analizadas previamente que habían conducido a los datos en figura 24. Se detectaron 58 residuos meCpAs y 49 residuos meCpTs, entre un total de 26,785 y 20,845, respectivamente, y ningún dinucleótido meCpC (ver figura 27 y 28). También se encontraron 6 meCpGs adicionales en posiciones CpG divergentes de la secuencia de referencia del VPH-16, aparentemente variantes genómicas del VPH-16.¹⁴⁵

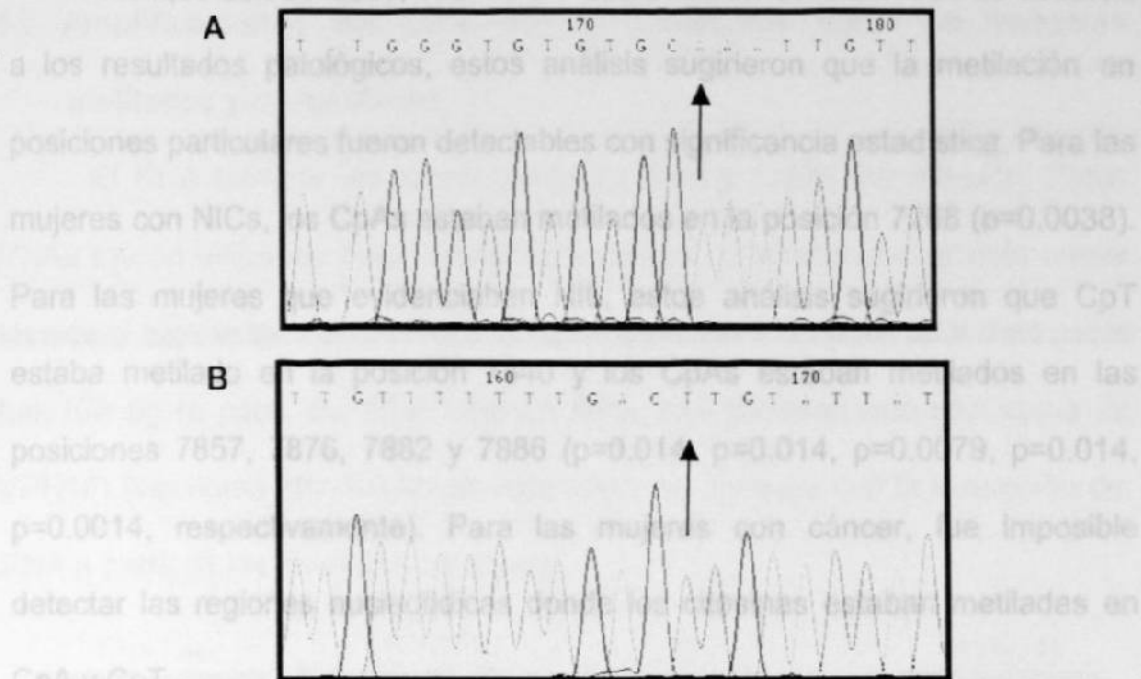


Figura 27. Cromatogramas mostrando la metilación en los dinucleótidos CpAs y CpTs. La figura muestra: A) La citosina metilada seguida de una adenina, lo que indica metilación en el dinucleótido CpA y, B) metilación en CpT.

Analizando estos patrones (ver figura 28) se sugirió que la metilación de *novo* era detectable con frecuencia en las posiciones 7268 y 7317, y con menos frecuencia en las posiciones 7840, 7857, 7876, 7882, 7886, 7903, 2, 13, 73, y 77 (probando la hipótesis que el promedio de la frecuencia de la metilación de las citosina fue mayor que la hipótesis nula, usando la prueba de t Student, $p=0.0015$, $p=0.0045$, $p=0.0015$, $p=0.0046$, $p=0.0015$, $p=0.0009$, $p<0.0001$, $p=0.0009$, $p=0.0046$, $p=0.0003$, $p=0.0026$ y $p=0.0046$, respectivamente). También, se detectó estadísticamente menos metilación de la citosina en las posiciones nucleotídicas 7301, 7327, 7554, 7602, 7689, 7829, 7829, 7841 a 7845, 7874, y en la posición 5 ($p=0.01$ para cada una).

Aunque son escasos, cuando los datos fueron estratificados de acuerdo a los resultados patológicos, estos análisis sugirieron que la metilación en posiciones particulares fueron detectables con significancia estadística. Para las mujeres con NICs, los CpAs estaban metilados en la posición 7268 ($p=0.0038$). Para las mujeres que evidenciaban NIL, estos análisis sugirieron que CpT estaba metilado en la posición 7840 y los CpAs estaban metilados en las posiciones 7857, 7876, 7882 y 7886 ($p=0.014$, $p=0.014$, $p=0.0079$, $p=0.014$, $p=0.0014$, respectivamente). Para las mujeres con cáncer, fue imposible detectar las regiones nucleotídicas donde los citosinas estaban metiladas en CpA y CpT.

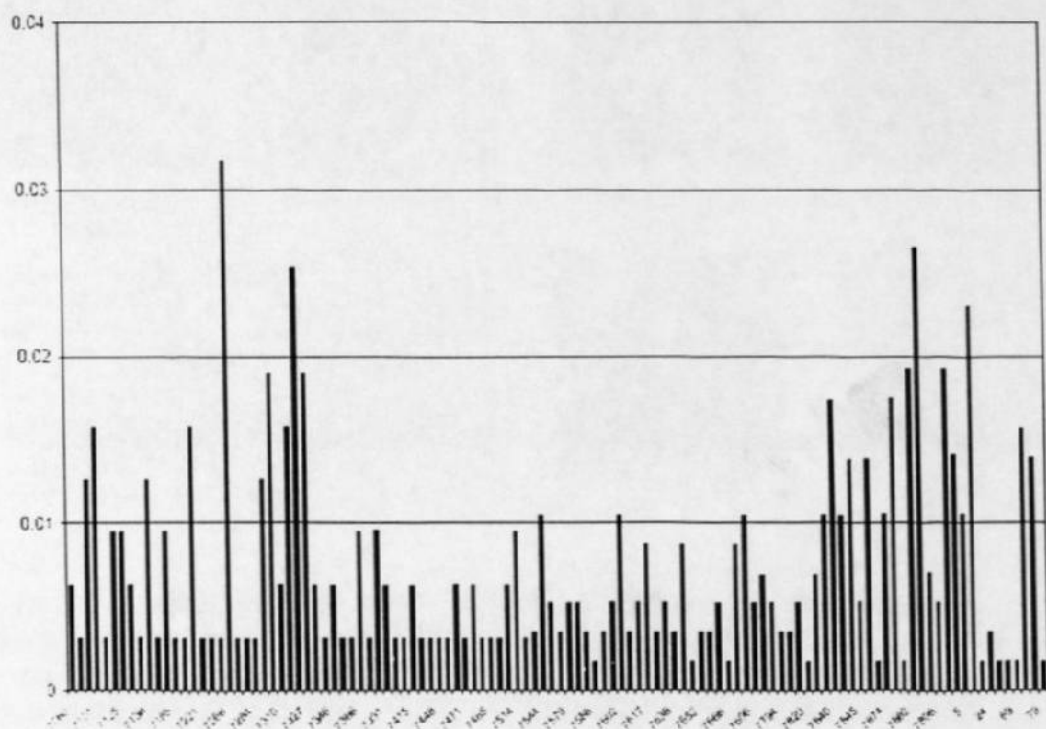
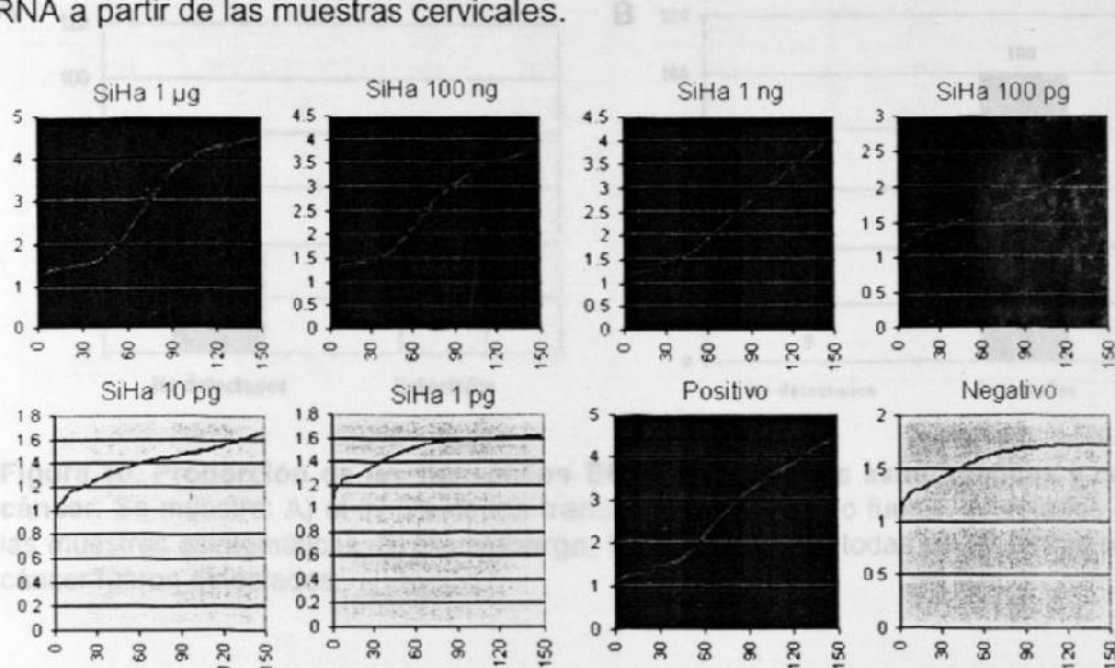


Figura 28. Metilación de las CpAs y CpTs en las 115 muestras analizadas. El diagrama muestra las posiciones y el porcentaje de metilación de los CpAs y CpTs detectados en este estudio.

5.7 Amplificación y detección de los transcritos E6/E7 en muestras dichas metiladas y no metiladas.

El RNA total de las líneas celulares SiHa y CaSki fue extraído. Estos RNAs fueron utilizados como controles positivos para estandarizar esta nueva técnica y bajo estas condiciones, la cantidad mínima de RNA total detectable fue 100 pg (a partir del RNA total de SiHa, que contiene una sola copia de VPH16) (ver figura 29). Concluido este paso, se continuó con la extracción del RNA a partir de las muestras cervicales.



Utilizando la prueba de Fisher no fue posible encontrar ninguna
Figura 29. Amplificación de VPH 16 usando NASBA en la línea celular SiHa. Las gráficas muestran las diferentes diluciones de SiHa (1 µg hasta 1 pg), así como a los controles positivo y negativo. Los cuadros en verde muestran las muestras positivas para la detección. El eje de las X muestra el tiempo de la reacción y el eje de las Y las unidades relativas de fluorescencia.

Correlación entre los transcritos detectados y metilación ($p=0.0112$ y $p>0.011$)
(ver tabla 6)
Solo 16 muestras (8 muestras asintomáticas y 8 muestras con cáncer)

fueron utilizadas para investigar la presencia de los transcritos E6/E7. La extracción del RNA fue llevada a cabo mediante la técnica conocida como

"Boom" y estos RNAs fueron utilizados para la amplificación y detección de dichos transcritos mediante la PCR tiempo Real.

Tabla 6. Resultado del análisis con NASBA en las muestras estudiadas.

Los transcritos E6/E7 del VPH 16 fueron detectados en 13 de 16 muestras (81%). En todas las muestras con cáncer (8/8) dichos transcritos pudieron ser detectados. Sin embargo al analizar las ocho muestras asintomáticas, tres de ellas dieron resultado negativo (ver figura 30).

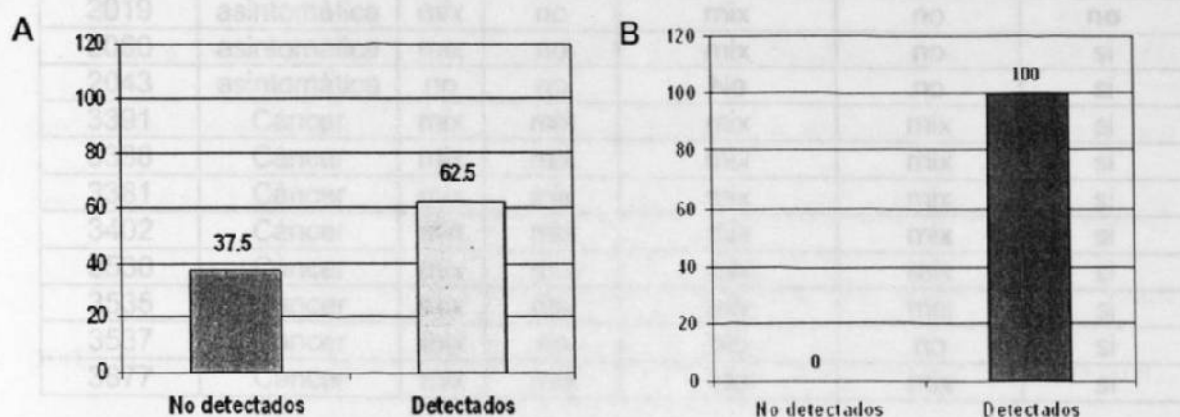


Figura 30. Proporción de los transcritos E6/E7 en muestras asintomáticas y con cáncer. Se muestra: A) el 37.5% de los transcritos de E6/E7 no fueron detectados en las muestras asintomáticas, B) Sin embargo, los transcritos de todas las muestras con cáncer fueron detectados.

Utilizando la prueba de Fisher no fue posible encontrar ninguna correlación entre el estado de metilación y la detección de los transcritos en los pacientes con cáncer; sin embargo los pacientes asintomáticos mostraron una correlación entre los transcritos detectados y metilación ($p=0.0112$ y $p>0.011$) (ver tabla 6).

Tabla 6. Resultado del análisis con NASBA en las muestras estudiadas.

Muestra	Diagnóstico	Región metilada				Detección de E6/E7
		L1	5' LCR	Potenciador	Promotor	
1272	asintomática	mix	Mix	No	no	si
1276	asintomática	mix	mix	No	no	si
1019	asintomática	NA*	NA	mix	mix	no
1062	asintomática	mix	mix	mix	mix	si
1915	asintomática	NA	NA	mix	no	no
2019	asintomática	mix	no	mix	no	no
2060	asintomática	mix	no	mix	no	si
2043	asintomática	no	no	No	no	si
3391	Cáncer	mix	mix	mix	mix	si
3388	Cáncer	mix	mix	mix	mix	si
3381	Cáncer	mix	mix	mix	mix	si
3402	Cáncer	mix	mix	mix	mix	si
3530	Cáncer	mix	mix	mix	mix	si
3535	Cáncer	mix	mix	mix	mix	si
3537	Cáncer	mix	no	No	no	si
3677	Cáncer	mix	mix	No	mix	si

*NA= no analizado por falta de DNA.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

Los recientes estudios genéticos y epigenéticos sobre el virus del papiloma humano han demostrado la importancia de la variación molecular, así como el papel de la metilación del virus en el desarrollo a CC. En este trabajo se incluyeron pacientes asintomáticas, atendidas en centros de salud pertenecientes a la Secretaría de Salud en el área metropolitana de Monterrey, N.L., así como también fueron incluidos pacientes con NICs en diferentes grados, con cáncer anal y con cáncer cervical de diferentes nacionalidades.

El empleo de múltiples juegos de oligonucleótidos permitieron detectar VPH en una alta proporción en muestras asintomáticas (27%), comparado con resultados derivados de estudios que utilizan un solo juego de oligonucleótidos. Mediante estos sistemas se detectaron 37 diferentes tipos de VPH en la población de Monterrey. En diversos estudios de mujeres con citología normal o con diferentes grados de NICs, VPH 16 se ha encontrado ser el tipo más prevalente seguido del VPH 31.^{146,147,148} En este estudio, los tipos 16 y 31

también fueron dominantes, indicando que la distribución de la infección del VPH es semejante en poblaciones europeas.

Esta investigación mostró que de cada uno de los cuatro tipos de VPH más prevalentes en esta cohorte mexicana existen en forma de numerosas variantes con diferencias genómicas significativas, lo cual origina la posibilidad de que estas variantes exhiban diferencias biológicas y patogénicas intra-tipo. Una vez que los programas de diagnóstico del DNA o de vacunación sean considerados para esta población, deberán ser examinadas ya sea, si las herramientas de diagnóstico o los epítopes, son afectados por mutaciones en alguna parte de los genomas de estas variantes del VPH-16, 18, 31, y 35.

Todas las variantes del VPH-16 pudieron ser identificadas inequívocamente, ya sea a la rama europea o a la rama asiático-americana del árbol filogenético del VPH-16. El VPH-16 es el único tipo el cual ha sido bien confirmado por numerosos estudios epidemiológicos^{149,150,151,152,153,154} y biológicos moleculares,^{155,156} que exhibe correlación de su variación genómica con sus características biológicas y epidemiológicas alteradas, que dan lugar al parecer al incremento carcinogénico de las variantes africanas y AA. Excepto en los indígenas americanos y en algunas poblaciones asiáticas, las variantes AA son frecuentes en la gente con un componente indígena-americano.^{150,157} Pero por otra parte, dichas variantes fueron encontradas solamente en España,¹⁰² posiblemente debido a la migración reversa de América Latina.

La prevalencia del 88% de la variante AA del VPH-16 en esta cohorte mexicana es la más alta detectada en cualquier parte del mundo. Esta observación y los datos de los reportes citados arriba, hacen posible que la exposición a las variantes del AA de VPH-16 contribuya al incremento en el riesgo de mujeres mexicanas para desarrollar el cáncer cervical. El alto porcentaje de las variantes del AA en el estado de Nuevo León es asombroso, ya que una gran parte de la población de este estado mexicano es considerada étnicamente de origen español, y aún entre los individuos categorizados explícitamente como mestizos, la contribución de genes indígenas ha sido medida como máximo de un 40%, 55% de europeos y un máximo del 5% para los marcadores genéticos africanos.¹⁵⁸ Así, como el VPH-16 infecta a la extensa mayoría de todas las poblaciones humanas, uno podría esperar que la distribución del virus siguiera características similares, tales como la distribución de los genes en el hospedero. Podría ser interesante dirigir la interrogante de si los componentes del comportamiento explicarán esta disparidad, o si las variantes AA del VPH-16 se distribuyen más eficientemente que las variantes E.

Alternativamente, pudiera ser que la migración haya afectado significativamente la distribución del virus en esta región; si los grupos que alguna vez fueron mantenidos separados por distancias extensas, se estén mezclando ahora sexualmente. Movimientos poblacionales entre poblaciones de América Central, México y de poblaciones hispanas en los Estados Unidos están bien documentados, y estas migraciones aumentan probablemente la ocasión del contacto sexual entre un migrante y hombres o mujeres de la

cultura del hospedero. En última instancia, estas influencias sociales pueden aumentar el riesgo de una mujer de Monterrey para adquirir las variantes virales que eran históricamente ausentes o raras en esta población.

El número de las muestras VPH-18 fue demasiado pequeño para llegar a cualquier conclusión. Un predominio de variantes europeas, según lo observado, sería lo esperado, y la presencia de las variantes africanas podría ser una posibilidad distinta debido a un elemento étnico africano en esta población. La ausencia del prototipo del VPH-18 en estas muestras es significativa, ya que esta secuencia brasileña (prototipo) es encontrada con frecuencia en las muestras sudamericanas.¹³³

Se determinaron árboles filogenéticos de las variantes del VPH-31 y del 35 basados en segmentos de la LCR de estos virus que se traslapan y se extienden hacia segmentos homólogos del VPH-16 y del VPH-18, los cuales han sido utilizados para las evaluaciones filogenéticas. Las variantes del VPH-31 son separadas en dos profundas ramas filogenéticas. Podría decirse que la primera rama con todas las variantes europeas y 13 de los 29 aislados mexicanos, representan los genomas europeos típicos del VPH-31. La segunda rama con 4 de los 6 aislados africanos y 16 de los 29 aislados mexicanos fue difícil de determinar. Parece razonable sugerir que esto podría representar los genomas originales del VPH-31 de los americanos, porque sería difícil explicar un alto predominio de aislados africanos en un país con solamente una pequeña fracción de migrantes africanos. La semejanza filogenética de las

variantes americana y africana sería algo evocadora a la situación con el VPH-16, donde las variantes asiático-americana (AA) y las africanas están relacionadas más de cerca una con otra que con las variantes europeas.

Las variantes del VP-35 fueron clasificadas en dos categorías, identificadas por la presencia o la ausencia de un segmento de 16 pb ausente en la clona de referencia del VPH-35 y de cuatro de los nueve aislados africanos. Mientras que esta distinción tiene que ser contada como una sola mutación, esta diferencia genómica, así como el número generalmente bajo de diferencias nucleotídicas, no permitieron establecer un árbol estable para las variantes del VPH-35. Puesto que todos los aislados mexicanos son idénticos a algunos europeos o a algunos aislados africanos, esta cohorte sugiere que el tipo VPH-35 estaba, o ausente de la América en épocas pre-Colombinas o que las variantes americanas del VPH-35 fueran indistinguibles de aquellas en Europa y África.

Los cerca del 30% de todos los tumores malignos en mujeres en México son carcinomas cérvico-uterinos,^{159,160,161,162} haciendo de este cáncer una preocupación oncológica principal de salud pública. Mientras que esta alta prevalencia podrá probablemente deberse al comportamiento y también a la carencia apropiada de la asistencia médica,^{163,164} estos datos originan la posibilidad que la carga viral específica, es decir, una epidemia única con variantes de los tipos de VPHs que difieran de aquellos en Europa y los Estados Unidos, contribuyan a este problema.

La segunda parte de este trabajo se concretó al estudio detallado de la metilación del DNA en un segmento de 913 pb del genoma del VPH-16, abarcando parte del gen L1 y la LCR completa de los genomas virales en la línea celular CaSki y en 115 muestras de pacientes. En conjunto, esta investigación reporta el análisis de las frecuencias de metilación y posición de CpGs entre un total de 9,090 sitios potenciales blanco (la suma analizando las muestras clínicas y las clonas de CaSki). Estos datos confirman que los genomas del VPH-16 son eficientes blancos de la maquinaria de metilación de CpGs epitelial, originando preguntas en cuanto al mecanismo de esta reacción y de las consecuencias biológicas para la célula epitelial y/o el ciclo de vida del VPH-16.

No se detectó un solo segmento genómico del VPHV-16 que estuviera completamente metilado o al menos en un grado de hipermetilación. En un estudio previo,¹²⁶ encontraron que de 15 muestras clínicas 5 parecían estar completamente metiladas en el segmento potenciador-promotor. Creemos que estos datos actuales son más representativos del destino típico de los genomas del VPH-16, ya que los descubrimientos anteriores fueron basados en un segmento genómico mucho más corto y con la técnica de secuenciación directa, la cual pudo haber registrado como completamente metilados mezclas de DNAs del VPH-16 que estaban metilados o no metilados en la misma posición.

De manera general, se tiene que concluir que hay mucho "ruido" en la metilación del DNA del VPH-16, es decir no hay sitios que están siempre o nunca metilados, ni hay estrechos conservados contiguos de metilación de CpG en la mayoría de moléculas. A pesar de esto, se reporta la observación notable de la eficiencia disminuida de la metilación en tres regiones, notablemente los sitios 7270 y 7862, y en un menor grado los sitios que flanquean a 7535 y 7554. Cabe notar la interpretación de estas posiciones en el contexto de elementos activantes en cis conocidos y de la estructura de la cromatina que se encuentran en la LCR del VPH-16. Del segmento 3' a la posición 7862, la cual está a menudo fuertemente metilada, contiene todos los elementos del promotor; es decir el activador del promotor Sp1, cuya unión no está influida por la metilación del DNA,¹⁶⁵ el factor viral E2, el cual es desplazado por la metilación, y la caja TATA. Este segmento entero está organizado en forma de un nucleosoma posicionado específicamente, cuyo estado de metilación y acetilación puede afectar al promotor.¹⁶⁶ La posición 7862 está localizada en el extremo 5' de este nucleosoma y coincide sobre una región estrecha de cerca de 80 pb con el origen de la replicación viral, así como con un silenciador transcripcional regulado por YY1 y CDP, y el extremo 3' del potenciador viral, activado por AP-1. Esta región ha sido caracterizada antes como un súper regulador, ya que YY1 y CDP con sus actividades de HDAC asociadas, y AP-1 con una actividad de histona acetilasa, reprimen y activan la transcripción del VPH en las diversas capas epiteliales, influyendo sobre el nucleosoma en el promotor y a un segundo nucleosoma sobre el potenciador viral.^{167,168,169} La metilación y no metilación del CpG en la posición 7862 pudiera agregar otra

función a esta región cis-actuante. Además, la posición 7862 forma parte de un sitio de unión a E2 relevante en la activación de la replicación activa del VPH, y este sitio tiene que permanecer desmetilado para permitir que el VPH-16 entre a otra ronda de replicación. Finalmente, el hecho de que la posición 7862 esté cerca de un sitio Sp1 altamente conservado entre los VPHs,⁷⁵ es reminiscente de la capacidad de Sp1 de suprimir la metilación de algunos elementos adyacentes a CpG.¹⁷⁰ Las propiedades de este segmento de DNA podría establecer las bases moleculares para el estado pobremente definido de "latencia" en las infecciones por VPH, ya que en la presencia del DNA de VPH con la ausencia de lesión, con la represión del potenciador y promotor y el acceso al origen de replicación podrían llevar al mantenimiento de la replicación del virus sin la expresión de las funciones transformantes.

En estos estudios de la cromatina del VPH-16, también se ha mapeado el extremo 5' del siguiente nucleosoma 5' a la posición 7862, el cual cubre la mayoría de los sitios de unión del potenciador del VPH-16, y también se encontró cerca de la posición 7590 una unión nucleosomal,⁸¹ la cual parece exceder la longitud de las uniones típicas y puede incluir a las posiciones 7535 y 7554. Estudios de sensibilidad a la DNAsa I sugirieron posicionamientos específicos adicionales del nucleosoma 5' en esta región, los cuales estaban separados por otra unión alrededor de la posición 7270. Estos argumentos conducirían a una propuesta en la que el DNA del VPH-16 tiende a estar hipermetilado en segmentos organizados nucleosomalmente, y desmetilados en las uniones nucleosomales. Esta propuesta suena, a primera vista sin sentido,

pero pudiera tener un significado funcional, cuando se considera el descubrimiento de que el DNA incorporado nucleosomalmente no esta protegido del mantenimiento de la metilación CpG, sino todo lo contrario¹⁷¹.

Aunque una gran cantidad de muestras biológicas fueron estudiadas, un número muy diverso de sitios fueron caracterizados. Por consiguiente, estas pruebas estadísticas fueron ajustadas según el tipo de comparación; sin embargo, algunas relaciones que fueron detectadas con menos precisión fueron reportadas. Es probable que un número más grande de muestras biológicas hubiera demostrado patrones más exactos de metilación de la citosina en CpA y CpT, especialmente cuando los especímenes de mujeres con NIL, NICs y cáncer fueron comparados. Esta observación de los residuos del meCpA y del meCpT confirma que los genomas del VPH son blancos eficientes en células indiferenciadas en cultivo celular. Mientras que se observó solamente un porcentaje total del 0.4% de metilación en estos dos dinucleótidos, la frecuencia real de la metilación de *novó* es probablemente mucho más alta, como los CpGs, los cuales se pudieron caracterizar solo en el "conjunto de datos del mantenimiento de la metilación", pero no en el "conjunto de datos de metilación de *novó*", los cuales son blancos mas eficientes de las enzimas *DNMT3* que los otros tres dinucleótidos. Por lo tanto, es posible estimar que el porcentaje de incidencia total de la metilación de *novó* se aproxima a varios puntos del porcentaje por cada residuo de citosina. La incidencia de la metilación de *novó* en un tejido somático ha sido pobremente estudiada, pero no es de extrañarse, ya que las actividades de *DNMT3a* y de *b* han sido detectadas en una variedad

de células somáticas normales, como son los ambientes celulares sin considerar a los embriones o a las células de progresión a cáncer,^{172,173} donde han sido estudiadas más frecuentemente. Extrañamente, los meCpAs, y los meCpTs parecen ocurrir frecuentemente en regiones donde no hay metilación de los CpGs, y se podría especular sobre un modelo donde el mantenimiento de la metilación es particularmente eficiente dentro de nucleosomas, mientras que la metilación de *novo* es eficiente en las uniones nucleosomales. Mientras que estas últimas observaciones no son estadísticamente significativas para la mayoría de los sitios basados en este conjunto de datos, es interesante que 14 de los 22 residuos de meCpA y de meCpT observados por Kim y cols.¹⁷⁴ en cultivos celulares conteniendo VPH-16, ocurrieran en las uniones nucleosomales que flanqueaban las posiciones 7535/7554 y 7862.

Se pudo investigar el DNA del VPH-16 en tres diferentes contextos clínicos: (i) en las infecciones asintomáticas (NIL), (ii) en NICs de grado bajo y alto, y (iii) en cáncer. Se encontró metilación en el genoma viral en estas tres poblaciones celulares, aunque con diferentes prevalencias.

Estos hallazgos presumiblemente episomales de metilación en el DNA del VPH en pacientes asintomáticos son interesantes. No se sabe de un panorama molecular que pudiera ser comparable al mantenimiento persistente del VPH en infecciones preneoplásicas con la posible excepción de la metilación de una isla de CpG en los promotores del EBNA del virus Epstein-Barr. Mientras que esta alteración ocurrió en células B asintomáticas, así como

durante la progresión a cáncer, ésto se interpretó como un soporte del proceso tumorigénico mediante la eliminación de antígenos EBNA.¹⁷⁵ Por lo tanto, este estudio no puede dar todavía una respuesta de que lo que se observó aquí es un mecanismo de defensa epitelial contra DNA heterólogo, o una adaptación viral para ser mantenido y amplificado en un epitelio sin causar una neoplasia. Según lo discutido arriba, se propone que el acceso al origen de replicación viral con la supresión correspondiente de la transcripción pudiera ser interpretado como una adaptación evolutiva al estado latente, un estado molecular y término científico, el cual todavía no ha sido formalmente reconocido para los VPHs como ha sido para los virus del herpes. Kim y cols.,¹⁷⁴ reportaron un exceso de metilación en los genomas del VPH-16 en células no diferenciadas en cultivo. Por lo que una relación estable entre los genomas metilados del VPH y el mantenimiento del estado no diferenciado, podría ser una representación del estado latente.

Los niveles bajos de metilación de los genomas del VPH en lesiones NICs pudieran representar una población celular expandida en estas lesiones que son transcripcionalmente activas, como se esperaría a la iniciación de un proceso neoplásico inducido por un virus junto con un aumento en el número de los genomas virales, como se sabe que ocurre en estas lesiones¹⁷⁶. Esta observación puede probablemente ser mejor comparada con el ciclo de vida productivo del poliovirus y de los adenovirus que son altamente activos transcripcionalmente.

La detección de una "hipermetilación" en genomas del VPH-16 presuntamente recombinados cromosomalmente en cáncer puede ser interpretada como una confirmación de la "hipótesis de la defensa del genoma" basada en la frecuencia de la metilación de retrovirus y transgenes integrados cromosomalmente¹⁷⁷ y en los estudios iniciales de la metilación de genomas adenovirales transfectados y sus blancos cromosomales.^{178,179} Como generalmente se sabe, el VPH-16 ocurre en carcinomas más a menudo en el estado integrado.^{42,180} La observación de una hipermetilación del VPH-16 en cáncer no apoya la propuesta de una publicación previa, del grupo de nuestro colaborador.¹²⁶ En ese estudio ellos observaron que la falta de metilación podía ser útil diagnósticamente para identificar lesiones progresivas, esto probablemente debido al pequeño número de muestras en el estudio, las cuales también fueron principalmente estudiadas mediante la digestión con McrBC en vez de secuenciación después de la modificación con bisulfito.

Lo anterior no debe ser interpretado de ninguna manera para decir que los cánceres no contienen genomas de VPH muy activos transcripcionalmente, puesto que el ejemplo es la línea celular CaSki,^{126,140} la cual demuestra que los carcinomas a menudo contienen genomas de VPH integrados en tándem, mismos que son blancos eficientes de la metilación, mientras que algunos de estos genomas permanecen desmetilados y por lo tanto son activos expresores de los oncogenes virales.^{126,140} Bajo esta observación se llevó a cabo la técnica NASBA para detectar los transcritos de los oncogenes virales en muestras con cáncer y asintomáticas metiladas y no metiladas. En todas las muestras con

cáncer los transcritos fueron detectados, aún con el promotor o el potenciador metilado, lo cual era de esperarse por lo demostrado con CaSki. Sin embargo no en todas las muestras asintomáticas fue posible detectar los transcritos. Es imposible hasta este punto hacer una correlación entre la patología, la metilación y la detección de los transcritos, debido al número tan pequeño de muestras analizadas.

Estos resultados introducen una nota de precaución antes de pregonar que los inhibidores de la metilación, resultando en desmetilación y por lo tanto activación de los genes supresores de tumor reprimidos, serán benéficos para todas los tipos de cáncer, ya que ellos representarían sustancias promotoras de tumores en el caso de lesiones activadas por VPH.¹⁸¹ Mientras que la metilación incrementada en el gen L1 en estas muestras pudiera apuntar hacia a un papel de la metilación en la transición entre los estados temprano-tardío, también se pudiera considerar que CpGs presentes en regiones "no importantes" tuvieran una propensión más altas a metilarse y pudieran ser los núcleos desde donde la metilación de los CpGs pudiera esparcirse hacia las regiones promotoras.¹⁸²

CAPITULO VII

CONCLUSIONES

- Se recolectaron, procesaron y estudiaron 1282 muestras cervicales del área metropolitana de Monterrey, N. L.
- Se detectaron 305 pacientes con VPH, encontrándose 38 diferentes tipos de VPHs, 16 de alto riesgo, 6 de bajo riesgo y 16 no identificados.
- Se analizó la variabilidad genómica de 112 muestras VPH 16, 29 muestras VPH 31, 15 muestras VPH 18 y 7 muestras VPH 35.
- Se detectó un 88% de la variante AA y 12% de la variante E en las muestras VPH 16. La variante E fue la predominante en las muestras VPH 18. Veinticinco diferentes variantes del VPH 31 fueron detectadas, encontrándose 27 cambios nucleotídicos y una delección de 7 pb. La variación en las muestras del VPH 35 mostró 8 variantes con un total de 10 cambios nucleotídicos y de una inserción de 16 pb.
- Se analizó el patrón de metilación de 115 muestras VPH 16-positivas utilizando la modificación con bisulfito y la amplificación mediante PCR, seguida de una clonación y secuenciación.
- Se observaron heterogeneidades importantes entre clonas de diferentes muestras, así como también entre clonas derivadas de muestras

individuales. La metilación en la mayoría de los sitios fue más alta en cáncer y más baja en displasias.

- La frecuencia de la metilación de los CpGs fue del 14.5%. Además, 0.21 y 0.23%, respectivamente, para los sitios CpA, y CpT, los cuales son indicadores de metilación de novo.
- Se detectaron transcritos en todas las muestras con cáncer. No se detectaron transcritos en muestras normales con la región promotora metilada.
- Los resultados sugieren que tanto la extensa diversidad de las variantes intra-tipo con características patógenas desconocidas, así como la implicación de la metilación en la expresión de los oncogenes del VPH, juegan un papel fundamental en la progresión a la carcinogénesis.

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

1. Connie H. Y., Fundamentals in oncology, Part 1. 1997, Section 1:11.
2. Dillner J. Trends over time in the incidence of cervical neoplasia in comparison to trends over time in human papillomavirus infection. *J Clin Virol* 2000;7-23.
3. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;80:827-841.
4. Lazcano E, Nájera P, Alonso P, et al. Programa de detección oportuna de cáncer cervical en México. Diagnóstico situacional. *Rev Inst Nat Cancerol (Mex)* 1996 42:123-140.
5. Secretaría de Salud. Estadísticas Vitales. México, 1997.
6. IARC. Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Worldwide, Globocan 2000, Version 1.0, IARC 2000.
7. Watkins MM, Gabali C, Winkleby M, Gaona E, Lebaron S. Barriers to cervical cancer screening in rural Mexico. *Int J Gynecol Cancer*. 2002;12:475-9.
8. www.salud.gob.mx/apps/htdocs/estadisticas/mortalidad/2001/Mortalidad_C16_2001.xls
9. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud de México. Registro Histopatológico de Neoplasias en México. 1999. pp. 15-28.
10. Hystologic surgical pathology de Stenberg.
11. Shah KV and Howley PM. En: *Fields Virology* (Eds. Fields BN, Knipe DM y Howley PM y cols.) Lippincott-Raven, Publishers. Philadelphia.1996. pp:2077-2109.
12. Helland A, Olsen AO, Gjoen K, Akselsen HE, Sauer T, Mangus, Borresen-Dale AL, Ronningen KS. An increased risk of cervical intra-epithelial neoplasia grade II-III among human papillomavirus positive patients with the HLA-DQA1*0102 - DQB1*0602 haplotype: a population -based case control study of Norwegian women. *Int J Cancer* 1998;76:19-24.
13. Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L. Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature*. 1998;393:229-34.
14. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science*. 1991;254:1167-73.
15. Muñoz N and Bosh X. *Bulletin of PAHO* 1996;30:362-77.
16. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W and Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA sequences in human tumors: I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* 1974;13: 650-56.
17. zur Hausen H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1977;78:1-30.

18. Dürst M, Gallahan D, Jay G, Rhim JS. Glucocorticoid-enhanced neoplastic transformation of human keratinocytes by human papillomavirus type 16 and an activated ras oncogene. *Virology* 1989;173:767-71.
19. Gubert NL, Sedman SA, and Schiller JT. Human papillomavirus type 16 E6 increases the degradation rate of p53 in human keratinocytes. *J. Virol.* 1992;66:6237-41.
20. Cobrinik D, Dowdy SF, Hinds PW, Mittnacht S and Weinberg RA. The retinoblastoma protein and the regulation of cell cycling. *TIBS* 1992;17:312-15.
21. Scheffner M, Münger K, Byrne JC and Howley PM. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991;88:5523-27.
22. Gorodeski GI, Romero MF, Hopfer U, Rorke E, Utian WH, and Eckert RL. Human uterine cervical epithelial cells grown on permeable support: a new model for the study of differentiation. *Differentiation* 1994;56:107-118.
23. Schneider A and Koutsky L. Epidemiology of Cervical Cancer and of HPV infection. In *Epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer* (eds. N. Muñoz, F. X. Bosch, K. V. Shah and A. Meheus). International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. 1992;119:3-53.
24. Boring CC, Squires TS, Tong T, et al. Cancer statistics 1994. *CA Cancer J Clin* 1994;44:7-26.
25. Cho KR. Cervical Cancer. In Vogelstein B, Kinzler KW (editors). *The Genetic Basis of Human Cancer*, 1998:631-37
26. Krebs HB. Lesiones premalignas del cuello uterino. En Copeland LJ, Jarnell JF (editores). *Ginecología* 1994:932-60.
27. Disaia PS, Creasman WT. Enfermedad del cuello uterino. *Ginecología Clínica*. 1994;1-36.
28. González de León C, Kudelka AP, Edwards CL, Kavanagh JJ. Carcinoma of the Uterine Cervix. *Medical Oncology*. 1993:255-70.
29. Strauss MJ, Shaw EW, Bunting H, Melnick JL. Crystallinevirus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1949;72:46.
30. Crawford LV & Crawford EM. A comparative study of polyoma and papilloma viruses. *Virology* 1963,21:258-63.
31. zur Hausen H. Condylomata acuminata and human genital cancer. *Cancer Res.* 1976;36:530.
32. Meisels A & Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina. I. Cytologic patterns. *Acta Cytol.* 1976;20:505-509.
33. Meisels A, Roy M, Fortier M, Morin C, Casas-Cordero M, Shah KV, Turgeon H.J. Human papillomavirus infection of the cervix: the atypical condyloma. *Acta Cytol.* 1981;25:7-16.
34. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H & zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1983;80:3812-3815.
35. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer and in cell lines derived from genital cancer. *EMBO J.* 1984;3:1151-1157.
36. Gissmann L & zur Hausen H. Human papilloma viruses: physical mapping and genetic heterogeneity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1976;73:1310-13.
37. Gissmann L, Pfister H & zur Hausen H. Human papilloma viruses (HPV): characterization of four different isolates. *Virology* 1977;76:569-80.

38. Orth G, Favre M & Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J. Virol.* 1977;24:108-120 .
39. Gissmann L & zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). *Int. J. Cancer* 1980;25:605-609.
40. Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon H & zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA from a laryngeal papilloma. *J. Virol.* 1982;44:393-400.
41. Law MF, Lancaster WD & Howley PM. Conserved polynucleotide sequences among the genomes of papillomaviruses. *J. Virol.* 1979;32:199-207.
42. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremmlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus type 18 and 16 sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111-114.
43. Dürst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE and Gissmann L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1987;1:251-256.
44. Pirisi L, Yasumoto S, Fellery M, Doninger JK & DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* 1987;61:1061-1066.
45. Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM & Schlegel R. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 1989;63:4417-4423.
46. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Columbia and Spain. *Int. J. Cancer* 1992;52:743-749.
47. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl Cancer Inst.* 1995;87:796-802.
48. IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks of Humans: Human Papillomaviruses Vol. 64 (IARC, Lyon, 1995).
49. <http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/VIRAL.HTM>.
50. www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Papovaviruses.html
51. Favre M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J. Virol.* 1975;15:1239-1247.
52. zur Hausen H. Papillomaviruses in Human cancers. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 1999;111:581-587.
53. Torrisi A, Del Mistro A, Onnis GI, Merlin F, Bertorelle R, Minucci D. Colposcopy, cytology and HPV testing in HIV-positive and HIV-negative women. *Eur. J. Gynecol. Oncol.* 2000;21:168-172.
54. Van Rants M, Tachezy R, Burk RD. Human papillomavirus types: a never-ending story. In *Papillomavirus reviews*, Lacey C (ed.). Leeds University Press: Leeds, 1996;1-20.
55. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Srijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12-9.
56. Huang S, Afonina I, Miller BA, Beckmann AM. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int J Cancer.* 1997;70: 408-11.

57. Liaw KL, Hsing AW, Schiffman MH, You SL, Zhang T, Burk R, Chen CJ. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancer from Chinese women. *Int J Cancer*. 1997;73(5): 775-6.
58. Arends MJ, Buckley CH, Wells M. Aetiology, pathogenesis, and pathology of cervical neoplasia. *J Clin Pathol* 1998;51:96-103.
59. Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989;8:3905-3910.
60. Tommasino M and Crawford L. Human Papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. *BioEssays* 1995;17:509-518.
61. Jansen-Durr P. How viral oncogenes make the cell cycle. *Trends Genet* 1996;12:270-275.
62. Armstrong DJ, Roman A. The relative ability of human papillomavirus type 6 and human papillomavirus type 16 E7 proteins to transactivate E2F-responsive elements is promoter- and cell-dependent. *Virology* 1997;239:238-246
63. Martin LG, Demers GW, Galloway DA. Disruption of the G1/S transition in human papillomavirus type 16 E7-expressing human cells is associated with altered regulation of cyclin E. *J Virol* 1998;72:975-985.
64. von Knebel Doeberitz M, Rittmuller C, Aengeneyndt F, Jansen-Durr P, Spitkovsky D. Reversible repression of papillomavirus oncogene expression in cervical carcinoma cells: consequences for the phenotype and E6 p53 and E7-pRB interactions. *J Virol* 1994;68:2811-2821.
65. Massimi P, Pim D, Banks L. Human papillomavirus type 16 E7 binds to the conserved carboxy-terminal region of the TATA box binding protein and this contributes to E7 transforming activity. *J Gen Virol* 1997;78:2607-2613.
66. Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science*. 1990;248:76-79.
67. Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J* 1992;11:4248.
68. Alvarez-Salas LM, Velazquez A, Lopez-Bayghen E, Woodworth CD, Garrido E, Gariglio P, DiPaolo JA. Transcriptional repression in normal human keratinocytes by wild-type and mutant p53. *Cancer Lett*. 1995;91:85-92.
69. Stoppler H, Hartmann DP, Sherman L, Schlegel R. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. *J Biol Chem* 1997;272:13332-37.
70. Iftner T, Oft M, Bohm S, Wilczynski SP, Pfister H. Transcription of the E6 and E7 genes of human papillomavirus type 6 in anogenital condylomata is restricted to undifferentiated cell layers of the epithelium. *J Virol* 1992;66:4639-4646.
71. Chow L, Hirochika H, Nasser M, Stoler M, Wolinsky S, Chin M. Human papillomavirus gene expression in papillomaviruses. *Cancer Cells* 1987;5:55-72.
72. Gius D, Grossman S, Bedell MA, Laimins LA. Inducible and constitutive enhancer domains in the noncoding region of human papillomavirus type 18. *J Virol*. 1988;62:665-72.
73. Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol*. 1987;61:962-71.
74. Demeret C, Desaintes C, Yaniv M, Thierry F. Different mechanisms contribute to the E2-mediated transcriptional repression of Human papillomavirus type 18 viral oncogenes. *J. Virol* 1997;71:9343-49.

75. Tan SH, Leong LEC, Walker PA, Bernard HU. The human papillomavirus type 16 transcription factor E2 binds with low cooperativity to two flanking binding sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIID. *J. Virol* 2000;68:6411-6420.
76. Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:5799-803.
77. Apt D, Chong T, Liu Y, Bernard HU. Nuclear factor I and epithelial cell-specific transcription of human papillomavirus type 16. *J. Virol* 1993;67:4455-4463.
78. Chan WK, Klock G, Bernard HU. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long region of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J. Virol* 1989;63:3261-3269.
79. Garcia-Carranca A, Thierry F, Yaniv M. Interplay of viral and cellular proteins along the long control region of human papillomavirus type 18. *J. Virol* 1988;62:4321-4330.
80. Gloss B, Bernard HU, Seedorf K and Klock G. The upstream regulatory region of the human papillomavirus-16 contains an E2 protein independent enhancer which is specific for cervical carcinoma cells and regulated by glucocorticoid hormones. *EMBO J.* 1987;6:3735-3743.
81. Stünkel W and Bernard HU. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J. Virol* 1999;73:1918-1930.
82. Pattison S, Skalnik DG and Roman A. CCAAT displacement protein, a regulator of differentiation-specific gene expression, binds a negative regulatory element within the 5' end of the human papillomavirus type 6 long control region. *J. Virol* 1997;71:2013-2022.
83. Romanczuk H, Howley PM. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalisation capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3159-3163.
84. Kovelman R, Bilter GK, Glezer E, Tsou AY, Barbosa MS. Enhanced transcriptional activation by E2 proteins from the oncogenic human papillomaviruses. *J Virol* 1996;70:7549-7560.
85. Kalantari M, Karsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynaecol Pathol* 1998;17:146-153.
86. Park JS, Hwang ES, Park SN, et al. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1997;65:121-129.
87. Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998;338:423-428.
88. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12:186-192.
89. Syrjänen KJ. Natural history of genital human papillomavirus infections. In *Papillomavirus Reviews*, Lacey C (ed.). Leeds University Press: Leeds, 1996;189-206.
90. Southern SA, Herrington CS. Molecular events in uterine cervical cancer. *Sex Transm Inf* 1998;74:101-109.
91. Herrington CS. Human papillomavirus and cervical neoplasia II: interaction with other factors. *J Clin Pathol* 1995;48:1-6.

92. Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:958-964.
93. Nead MA, McCance DJ. Activities of the transforming proteins of human papillomaviruses. In *Human Tumour Viruses*, McCance DJ (ed.). American Society for Microbiology: Washington, 1998;225-251.
94. Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease - natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995;61:306-311.
95. Moreno V, Munoz N, Bosch FX, et al. Risk factors for progression of cervical intraepithelial neoplasm grade III to invasive cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1995;4:459-467.
96. Ho GYG, Burk RD, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1365-1371.
97. Xi LF, Demers GW, Koutsky LA, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. *J Infect Dis* 1995;172:747-755.
98. Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:796-802.
99. Conrad-Stöppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 1996;70:6987-6993.
100. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. 1993;67:6413-23.
101. Wheeler GM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridization. *J Clin Microbiol* 1997;35:11-19.
102. Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997;71:2463-2472.
103. Desaintes C, Demeret C. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol*. 1996;7:339-47.
104. Bird AP. The relationship of DNA methylation to cancer. *Cancer Surv* 1996;28:87-101.
105. Costello JF and Plass C. Methylation matters. *J Med Genet* 2001;38:285-303.
106. Laird PW, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson SL, Jung WE, Li E, Weinberg RA, Jaenisch R. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell* 1995;8:197-205.
107. Bird AP and Wolffe AP. Methylation-induced repression-belts, braces, and chromatin. *Cell* 1999;99:451-454.
108. Heard E, Clerc P and Avner P. X-chromosome inactivation in mammals. *Annu Rev Genet* 1997;31:571-610.
109. Bartolomei MS and Tilghman SM. Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet* 1997;31: 493-525.

110. Riggs AD: X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975;14:9.
111. Holliday R, Pugh JE: DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975;187:226.
112. McGhee JD, Ginder GD: Specific DNA methylation sites in the vicinity of the chicken beta-globin genes. *Nature*. 1979;280:419.
113. Ginder GD, McGhee JD: DNA Methylation in the Chicken Adult β -Globin Gene: A Relationship With Gene Expression: Organization and Expression of Globin Genes. New York, NY, Liss, 1981:191.
114. Shen CK, Maniatis T. Tissue-specific DNA methylation in a cluster of rabbit beta-like globin genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:6634.
115. van der Ploeg LH, Flavell RA: DNA methylation in the human gamma delta beta-globin locus in erythroid and nonerythroid tissues. *Cell* 1980;19:947.
116. Razin A, Riggs AD: DNA methylation and gene function. *Science* 1980;210:604.
117. Tate PH and Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:226-231.
118. Hendrich B and Bird A. Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 1998;18:6538-6547.
119. Zhang Y, Ng HH, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A, Reinberg D. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 1999;13:1924-1935.
120. Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A. Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 1998;393:386-389.
121. Tyler JK and Kadonaga JT. The "dark side" of chromatin remodeling: repressive effects on transcription. *Cell* 1999;99:443-446.
122. Laird PW, Jaenisch R: The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* 1996;30:441.
123. Kautiainen TL, Jones PA: DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem* 1986;261:1594.
124. Rosl F, Arab A, Klevenz B and zur Hausen H.. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomavirus. *J. Gen. Virol.* 1993;74:791-801.
125. List HJ, Patzel V, Zeidler U, Schopen A, Ruhl G, Stollwerk J and Klock G. Methylation sensitivity of the enhancer from the human papillomavirus type 16. *J Biol Chem* 1994;269:11902-11911.
126. Badal V, Chuang LS, Tan EH, Badal S, Villa LL, Wheeler CM, Li BF, Bernard HU. CpG methylation of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J Virol.* 2003; 77:6227-34.
127. Ehrlich HA, Bugawan TL. HLA class II gene polymorphism: DNA typing evolution and relationship to disease susceptibility. In *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. Edited by HA Ehrlich. New York, 1989, pp 193-208.
128. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR and Wolinsky SM. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209-214.
129. Snijders PJF, van den Brule AJC, Schrijnemakers HFJ, Snow G, Meijer CJLM and Walboomers JMM. The use of general primers in the polymerase

- chain reaction permits the detection of a broad spectrum of human papillomavirus genotypes. *J. Gen. Virol.* 1990;71:173-181.
130. Noda T, Sasagawa T, Dong Y, Fuse H, Namiki M, Inoue M. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method. *Urol Res.* 1998;26:165-9.
 131. Fujinaga Y, Shimada M, Okazawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus DNA using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol.* 1991;72:1039-44.
 132. Ho L, Chan SY, Chow V, Chong T, Tay SK, Villa LL, Bernard HU. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J Clin Microbiol.* 1991;29:1765-72.
 133. Ong CK, Chan SY, Campo MS, Fujinaga K, Mavromara-Nazos P, Labropoulou V, Pfister H, Tay SK, ter Meulen J, Villa LL, et al. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J Virol.* 1993;67:6424-31.
 134. Pearson WR, Wood T, Zhang Z and Miller W. Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* 1997;46:24-36.
 135. Stewart AC, Eriksson AM, Manos MM, Munoz N, Bosch FX, Peto J and Wheeler CM. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J. Virol.* 1996;70: 3127-3136.
 136. Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavromara-Nazos P, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol.* 1993;67:6413-23.
 137. Kumar S and Gadagkar SR. Disparity index: a simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences. *Genetics* 2001;158:1321-1327.
 138. Boom R, Sol CJA, Salimans MMM, Jansen CL, Wertheimvan Dillen PME and van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 1990;28:495-503.
 139. Meyers G, Bernard HU, Delius H, Favre M, Icenogel J, van Ranst M and Wheeler C. Editors. *Human Papillomaviruses. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences*, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA. 1994.
 140. Van Tine BA, Kriops J, Broker TR, Chow LT and Moen PT. In situ analysis of the transcriptional activity of integrated viral DNA using tyramide-FISH. *Dev Biol (Basel)* 2001;106:381-385.
 141. Bird AP. The essentials of DNA methylation. *Cell* 1992;70:5-8.
 142. Dodge JE, Ramsahoye BH, Wo ZG, Okano M and Li E. De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene* 2002;289:41-48.
 143. Jones PA. Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003;983:213-219.
 144. Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP and Jaenisch R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000;97:5237-5242.

145. Calleja-Macias IE, Kalantari M, Huh J, Ortiz-Lopez R, Rojas-Martines A, Gonzales-Guerrero JF, Williamson AL, Hagmar B, Wiley DJ, Villarreal L, Bernard HU and Barrera-Saldana HA. High prevalence of specific variants of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 in a Mexican population. *Virology*, 2004;319:315-323.
146. Hansson BG, Forslund O, Bjerre B, Lindholm K, Nordenfelt E. Human papilloma virus types in routine cytological screening and at colposcopic examinations. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1993;52:49-55.
147. Nindl I, Lotz B, Kuhne-Heid R, Endisch U, Schneider A. Distribution of 14 high risk HPV types in cervical intraepithelial neoplasia detected by a non-radioactive general primer PCR mediated enzyme immunoassay. *J Clin Pathol*. 1999;52:17-22.
148. Jacobs MV, Walboomers JM, Snijders PJ, Voorhorst FJ, Verheijen RH, Franssen-Daalmeijer N, Meijer CJ. Distribution of 37 mucosotropic HPV types in women with cytologically normal cervical smears: the age-related patterns for high-risk and low-risk types. *Int J Cancer*. 2000;15:221-7.
149. Becker TM, Wheeler CM, McGough NS, Parmenter CA, Jordan SW, Stidley CA, McPherson RS and Dorin MH. Sexually transmitted diseases and other risk factors for cervical dysplasia among southwestern Hispanic and non-Hispanic white women. *JAMA* 1994;271:1181-1188.
150. Berumen J, Ordonez RM, Lazcano E, Salmeron J and Galvan SC. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst*. 2001;93:1325-1330.
151. Da Costa MM, Hogeboom CJ, Holly EA and Palefsky JM. Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 F6 sequence variant. *J. Infect. Dis*. 2002;185:1229-1237.
152. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M and Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect. Dis*. 1999;180:1415-1423.
153. Giannoudis A and Herrington CS. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J. Pathol*. 2001;193:295-302.
154. Giuliano AR, Papenfuss M, Schneider A, Nour M and Hatch K. Risk factors for high-risk type human papillomavirus infection among Mexican-American women. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 1999;8:615-620.
155. Kammer C, Warthorst U, Torrez-Martinez N, Wheeler CM and Pfister H. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P97 promoter activity. *J. Gen. Virol*. 2000;81:1975-1981.
156. Villa LL, Sichero L, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T and Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol*. 2000;81:2959-2968.
157. Lizano M and Garcia-Carranca A. Molecular variants of human papillomaviruses types 16, 18, and 45 in tumors of the uterine cervix in Mexico. *Gac. Med. Mex*. 1997;133:43-48.
158. Cerda-Flores RM, Budowle B, Jin L, Barton SA, Deka R and Chakraborty R. Maximum likelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 short tandem repeat loci. *Am. J. Human Biol*. 2002;14:429-439.

159. Gonzalez-Garay ML, Barrera-Saldana HA, Aviles LB, Alvarez-Salas LM and Ganglio P. Prevalence in two Mexican cities of human papillomavirus DNA sequences in cervical cancer. *Rev. Invest. Clin.* 1992;44:491-499.
160. Hernández-Avila M, Lazcano-Ponce EC, de Ruiz PA and Romieu I. Evaluation of the cervical cancer screening programme in Mexico: a population-based case-control study. *Int. J. Epidemiol.* 1998;27:370-376.
161. Silva B, Vargas-Alarcon G, Zuniga-Ramos J, Rodriguez-Reyna TS, Hernandez-Martinez B, Osnaya N, Kofman S, Torres-Lobaton A and Granados J. Genetic features of Mexican women predisposing to cancer of the uterine cervix. *Hum. Pathol.* 1999;30:626-628.
162. Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Daniel RW, Ghaffari AM, Solorza G and Shah KV. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol. Oncol.* 1998;70:115-120.
163. Lazcano-Ponce C, Moss S, Alonso de Ruiz P, Salmeron Castro J and Hernandez Avila M. Cervical cancer screening in developing countries: why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch. Med. Res.* 1999;30:240-250.
164. Lazcano-Ponce EC, Castro R, Al'en B, Najera P, Alonso de Ruiz PA and Hernandez Avila M. Barriers to early detection of cervical-uterine cancer in Mexico. *Women's Health* 1999;8:399-408.
165. Harrington MA, Jones PA, Imagawa M and Karin M. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988;85:2066-2070.
166. Stünkel W, Huang Z, Tan SH, O'Connor M and Bernard HU. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus-16 repress or activate the E6 promoter depending on the physical state of the viral DNA. *J. Virol.* 2000;74:2489-2501.
167. Ai W, Toussaint E and Roman A. CCAAT displacement protein binds to and negatively regulates human papillomavirus type 6 E6, E7, and E1 promoters. *J. Virol.* 1991;73:4220-4229.
168. O'Connor MJ, Stünkel W, Koh CH, Zimmermann H and Bernard HU. The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of human papillomaviruses. *J. Virol.* 2000;74:401-410.
169. Bernard HU. Gene Expression of Genital Human Papillomaviruses and Potential Antiviral Approaches. *Antiviral Therapy* 200;27:219-237.
170. Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A and Cedar H. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 1994;371:435-438.
171. Okuwaki M and Verreault A. Maintenance DNA methylation of nucleosome core particles. *J. Biol. Chem.* 2004;279:2904-2912.
172. Jaenisch R and Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Gen.* 2003;33:245-254.
173. Robertson KD, Uzvolgyi F, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA and Jones PA. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:2291-2298.
174. Kim K, Garner-Hamrick PA, Fisher C, Lee D and Lambert PF. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J. Virol.* 2003;77:12450-12459.

175. Robertson KD. The role of DNA methylation in modulating Epstein-Barr Virus gene expression. In: DNA methylation and cancer. Springer Verlag Berlin. 2000:21-34.
176. Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT and Broker TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. Hum Pathol 1992;23:117-128.
177. Bestor TH and Tycko B. Creation of genomic methylation patterns. Nat. Genet. 1996;12:363-367.
178. Doerfler W, Remus R, Muller K, Heller H, Hohlweg U, Schubert R. The fate of foreign DNA in mammalian cells and organisms. Dev. Biol. (Basel). 2001;106:89-97.
179. Sutter D and Doerfler W. Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1980;77:253-256.
180. Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L, Vallikad E and Krishna S. Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. J. Gen. Virol. 1995;76:2589-2593.
181. Herman, J.G., and Baylin, S.B. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. In: Jones, P.A. and Vogt, P.K. (eds.) DNA methylation and cancer. Springer, Berlin, 2000:35-54.
182. Nguyen C, Liang G, Nguyen TT, Tsao-Wei D, Groshen S, Lubbert M, Zhou JH, Benedict WF, Jones PA. Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells. J. Natl. Cancer Inst. 2001;93:1465-1472.