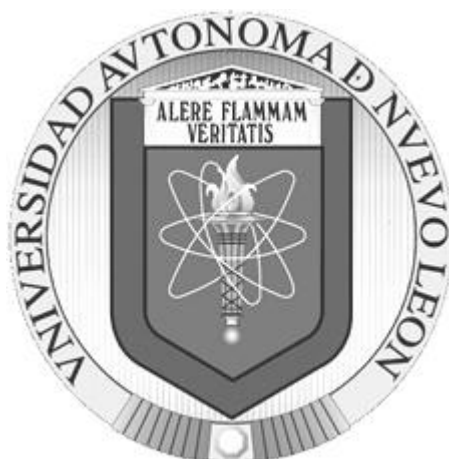


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ANÁLISIS DEL ESTATUS DEL GENOMA VIRAL EN MUJERES
INFECTADAS CON EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

Por:

I.B.Q. GREGORIO ANTONIO ALCÁZAR GONZÁLEZ

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con
orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.**

Enero, 2011

**"ANÁLISIS DEL ESTATUS DEL GENOMA VIRAL EN MUJERES INFECTADAS
CON EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO"**

Aprobación de la Tesis:



DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Director de Tesis



DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ
Co-Director de Tesis



DRA. MARIA DE LOURDES GARZA RODRÍGUEZ
Co-Director de Tesis



DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**Laboratorio de Genómica y Bioinformática,
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular**

Tesis del I.B.Q. Gregorio Antonio Alcázar González

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con
orientación terminal en Biología Molecular.**

**ANÁLISIS DEL ESTATUS DEL GENOMA VIRAL EN MUJERES
INFECTADAS CON EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO**

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Genómica y Bioinformática del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y la Co-Dirección de la Dra. Rocío Ortiz López y la Dra. María de Lourdes Garza Rodríguez.

DR HUGO A. BARRERA SALDAÑA

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por permitirme culminar esta etapa de mi vida para poder seguir creciendo tanto personal como profesionalmente.

A mis mejores amigos y consejeros, papás y hermanos, José Luis, María Elena, Nohemí y José Luis, que me dieron su apoyo incondicional, estando en los momentos más difíciles para darme palabras de aliento y sabios regaños.

Al Dr. Hugo A. Barrera que ha sido un excelente tutor académico, colocando su confianza en mí, impulsándome a ir más allá de mis límites.

A las Dras. Rocío y Lulú por su ayuda, tiempo y esfuerzo para llevar a cabo este trabajo, orientándome para encontrar la respuesta y el camino correcto.

A mis amigos y compañeros que convirtieron los buenos momentos en excelentes y de los malos en aún mejores: Sergio, Jaz, Magda, Alan, Evelin, Artemisa, Giss, Iván, Jorge, Canale, Adelina, Richard, Mario, Selene, Azalea, Gloria, Sony, Diana, Adriana, Dany, Pablo, Martha, Marcela, Arturo, Normita, Alí, Clarita, Edith y a las demás personas que pasaron por mi vida durante de esta etapa.

A Susan por ser mi amiga y estar conmigo cuando más necesite de alguien.

Y a todas aquellas personas que olvido nombrar pero que siguen siendo igual de importantes.

TABLA DE CONTENIDO

SECCIÓN	PÁGINA
LISTA DE CUADROS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	
1.1 <i>Importancia del CaCU</i>	1
1.2 <i>Cáncer Cervico-Uterino</i>	1
1.2.1 <i>Etiología</i>	2
1.2.2 <i>Virus del Papiloma Humano</i>	3
1.3 <i>Carga Viral</i>	5
1.4 <i>Integración Viral en el genoma huésped</i>	6
1.4.1 <i>Descripción de E2</i>	7
1.4.2 <i>Ruptura de E2</i>	8
1.5 <i>Sitios de Integración celular</i>	10
CAPITULO II. JUSTIFICACIÓN	12
CAPITULO III. HIPÓTESIS	12
CAPITULO IV. OBJETIVOS	
4.1 <i>Objetivo general.</i>	13
4.2 <i>Objetivos específicos.</i>	13

CAPITULO V. MATERIALES Y MÉTODOS

<i>5.1 Lugar de realización del estudio</i>	14
<i>5.2 Grupo de Estudio</i>	14
<i>5.3 Materiales</i>	14
<i>5.3.1 Consumibles</i>	14
<i>5.3.2 Reactivos</i>	14
<i>5.3.3 Material biológico</i>	15
<i>5.3.4 Equipo</i>	15
<i>5.3.5 Programas Computacionales</i>	16
<i>5.4 Métodos</i>	16
<i>5.4.1 Estrategia General</i>	16
<i>5.4.2 Amplificación y clonación del exón 3 del gen de la β-actina</i>	17
<i>5.4.3 Amplificación y clonación del un fragmento del gen de GAPDH1</i>	17
<i>5.4.4 Curva Estándar para los genes de normalización de los ensayos de PCR en tiempo real</i>	17
<i>5.4.5 Re-caracterización del plásmido “VPH16MY11-CPI+TOPOXL 3k”</i>	19
<i>5.4.6 Curva Estándar para el gen E7</i>	20
<i>5.4.7 Obtención de la carga viral</i>	20
<i>5.4.8 Re-caracterización del plásmido “VPH16Af1+1FW-14REV+TOPOXL 5k”</i>	20
<i>5.4.9 Curva Estándar para el gen E2 y L1</i>	21
<i>5.4.10 Obtención del cociente integrado vs episomal</i>	21
<i>5.4.11 Diseño de iniciadores para encontrar el sitio de integración viral</i>	22
<i>5.4.12 Estandarización de la PCR de integración</i>	22
<i>5.4.13 Secuenciación del producto de PCR</i>	24
<i>5.4.14 Análisis de los productos de secuenciación</i>	26

CAPITULO VI. RESULTADOS

<i>6.1 Clonación de los productos de los genes para normalizar resultados</i>	27
<i>6.2 Clonación de los amplicones en el vector PCR TOPO XL</i>	28
<i>6.3 Realización de la curva de calibración para los genes de referencia para normalizar resultados</i>	28

<i>6.4 Lectura de los genes de referencia en las muestras positivas para VPH</i>	31
<i>6.5 Re-caracterización enzimática de clonas positivas para el genoma del VPH 16</i>	32
<i>6.6 Curva de calibración para el gen E7</i>	35
<i>6.7 Cuantificación de la carga viral</i>	36
<i>6.8 Curva de calibración para el gen E2 y L1 del VPH 16</i>	36
<i>6.9 Determinación del Coeficiente de Integración</i>	39
<i>6.10 Diseño de iniciadores</i>	45
<i>6.11 Estandarización de la PCR de integración</i>	45
<i>6.12 Secuenciación del producto de PCR</i>	49
<i>6.13 Análisis de los productos de secuenciación</i>	49

CAPITULO VII. DISCUSIÓN

<i>7.1 Determinación de la Carga Viral</i>	51
<i>7.2 Determinación del cociente de integración</i>	51
<i>7.3 Identificación del Sitio de Integración</i>	52

CAPITULO VIII. CONCLUSIÓN

<i>8.1 Determinación de la Carga Viral</i>	53
<i>8.2 Determinación del cociente de integración</i>	53
<i>8.3 Identificación del Sitio de Integración</i>	53

CAPITULO VI. BIBLIOGRAFÍA	54
----------------------------------	----

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. *Cálculos para obtener el número de copias requerido para la curva de calibración por PCR en tiempo real.*

Cuadro 2. *Continuación de los cálculos para obtener el número de copias de un plásmido.*

Cuadro 3. *Programa estándar de amplificación para PCR Tiempo Real, utilizando sondas TaqMan.*

Cuadro 4. *Determinación del cociente de integración, a través de la comparación de las regiones del gen E2 o L1 contra E7.*

Cuadro 5. *Secuencia de los iniciadores utilizados en el estudio.*

Cuadro 6. *Programa para la amplificación el sitio de inserción del VPH en el genoma humano.*

Cuadro 7. *Condiciones de la PCR-Sitio de Restricción.*

Cuadro 8. *Condiciones de mezcla para la reacción de secuenciación.*

Cuadro 9. *Condiciones utilizadas para la secuenciación en el termociclador.*

Cuadro 10. *Datos de amplificación de las muestras de referencia para la curva de calibración.*

Cuadro 11. *Lecturas de amplificación y número de copias para las muestras de estudio para los genes de referencia.*

Cuadro 12. *Cortes enzimáticos esperados para el vector que contiene la región subgenómica de 3Kb del genoma del VPH 16.*

Cuadro 13. *Cortes enzimáticos esperados para el vector que contiene la región subgenómica de 5Kb del genoma del VPH 16.*

Cuadro 14. *Datos de amplificación para las preparación con diferentes copias del gen viral E7.*

Cuadro 15. *Datos de la amplificación del gen viral E7 en las muestras estudiadas.*

Cuadro 16. *Amplificación de las diferentes regiones de E2 y L1 del plásmido conteniendo 5kb del genoma del VPH.*

Cuadro 17. *Amplificaciones de regiones del genoma del VPH en las muestras de estudio.*

Cuadro 18. *Número de copias por célula del genoma viral en cada una de las muestras, en función de los genes en estudio.*

Cuadro 19. *Determinación del coeficiente de integración del genoma viral.*

Cuadro 20. *Condiciones modificadas para llevar a cabo la PCR de integración.*

Cuadro 21. *Condiciones de PCR utilizando el oligonucleótido anidado L2-2.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. *Evolución de la infección causada por el VPH.*

Figura 2. *El VPH y su estructura molecular.*

Figura 3. *Conformación de la región de control larga del VPH de alto riesgo.*

Figura 4. *Interacción entre proteínas virales y proteínas celulares involucradas en el ciclo celular.*

Figura 5. *Estrategia general de la tesis*

Figura 6. *Representación estructural de la proteína del gen E2 del VPH,*

Figura 7. *Diagrama de flujo para la obtención del producto para secuenciación.*

Figura 8. *Amplificación de los genes de referencia GAPDH y β -actina para normalizar resultados.*

Figura 9. *Resultado de la PCR de colonia para un fragmento de ~300pb.*

Figura 10. *Gráfica de amplificación obtenida del software StepOne.*

Figura 11. *Curva de calibración para los datos de amplificación de los genes de referencia.*

Figura 12. *Digestiones enzimáticas de los vectores con el genoma de VPH.*

Figura 13. *Curva de calibración usando los datos de amplificación del gen E7 del VPH tipo 16.*

Figura 14. *Representación gráfica de la relación del grado de lesión con la carga viral*

Figura 15. *Curvas de calibración para los datos de amplificación de diferentes regiones del gen viral de E2 y L1.*

Figura 16. *Representaciones gráficas de las amplificaciones de las muestras.*

Figura 17. *Comparación del número de copias de los genes del VPH en cada una de las muestras estudiadas.*

Figura 18. *Sitios de ruptura comunes encontradas para las muestras en estudio.*

Figura 19. *Representación de la ruptura viral.*

Figura 20. *Gradiente de temperatura para la estandarización de la PCR de integración.*

Figura 21. *Prueba de eficiencia con los oligos RSO.*

Figura 22. *PCR del producto purificado, utilizando el oligo anidado L2-2 y el Eco-RSO.*

Figura 23. *Amplificación del producto purificado utilizando sólo el oligo L2-2.*

Figura 24. *Comparación de las secuencias de los amplicones de los sitios de integración de las muestras en estudio.*

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>CaCU</i>	<i>Cancer Cervico-Uterino</i>
<i>VPH</i>	<i>Virus del Papiloma Humano</i>
<i>ADN</i>	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
<i>p53</i>	<i>proteína tumoral 53</i>
<i>pRb</i>	<i>proteína retinoblastoma</i>
<i>LIEBG</i>	<i>lesión intraepitelial de bajo grado</i>
<i>LIEAG</i>	<i>lesión intraepitelial de alto grado</i>
<i>LCR</i>	<i>region de control larga (por sus siglas en inglés)</i>
<i>NIC</i>	<i>neoplasias malignas intracervicales</i>
<i>mCA</i>	<i>carcinoma microinvasivo</i>
<i>CIS</i>	<i>carcinoma in situ</i>
<i>pb</i>	<i>pares de bases</i>
<i>KDa</i>	<i>kilo daltons</i>
<i>ARNm</i>	<i>Ácido ribonucleico mensajero</i>
<i>TPB</i>	<i>proteína de unión a caja TATA</i>
<i>CFS</i>	<i>sitios frágiles comunes (de sus siglas en ingles)</i>
<i>MYC</i>	<i>myelocytomatosis</i>
<i>hTERT</i>	<i>Transcriptasa Reversa de la telomerasa humana (de sus siglas en ingles)</i>
<i>dNTPs</i>	<i>Desoxirribonucleósidos trifosfatados</i>
<i>hr</i>	<i>horas</i>
<i>s</i>	<i>segundos</i>
<i>Kb</i>	<i>kiloobases</i>
μ L	<i>microlitros</i>
$^{\circ}$ C	<i>centigrados</i>
<i>PCR</i>	<i>reacción en cadena de la polimerasa</i>
<i>RS-PCR</i>	<i>PCR- sitio de restricción (de sus siglas en ingles)</i>
<i>RSO</i>	<i>oligonucleótidos de sitio de restricción</i>
<i>min</i>	<i>minutos</i>

<i>pM</i>	<i>picomolar</i>
<i>ng</i>	<i>nanogramos</i>
<i>mM</i>	<i>milimolar</i>
μ <i>M</i>	<i>micromolar</i>
<i>U</i>	<i>unidades</i>
<i>mL</i>	<i>mililitro</i>
<i>EDTA</i>	<i>Acido etilendiaminotetracético</i>
<i>rpm</i>	<i>revoluciones por minuto</i>
<i>GAPDH</i>	<i>Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa</i>
<i>DO</i>	<i>densidad óptica</i>

RESUMEN

IBQ GREGORIO ANTONIO ALCÁZAR GONZÁLEZ

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular

Orientación Terminal: *Biología Molecular e Ingeniería Genética*

Título de estudio: “Análisis del Estatus del Genoma Viral en mujeres Infectadas con el Virus del Papiloma Humano”.

Introducción: *El cáncer cervicouterino (CaCU) es uno de los principales problemas de salud de las mujeres en el mundo, siendo la tercera causa de defunción por cáncer en México. Existen diversos factores de riesgo para esta neoplasia, siendo el más importante la infección por el virus del papiloma humano (VPH). Sin embargo, aunque la presencia del virus es necesaria, no es suficiente para el desarrollo de este cáncer. Además de los cofactores ambientales y hábitos de vida, últimamente se han reenfocado los estudios sobre los factores de riesgo hacia el estado del genoma viral: más particularmente en la carga viral, el grado de integración del genoma viral en el de la paciente y en el sitio de integración. Conocer el estado del genoma viral en las células de las pacientes afectadas podría aumentar el conocimiento para abatir esta enfermedad.*

Objetivo: *Analizar el estado del genoma del VPH en mujeres con lesiones intraepiteliales y tumores cervicales.*

Material y métodos. *Se utilizaron 20 muestras de ADN de lesiones y tumores positivas para VPH 16, provenientes de mujeres que han tenido un seguimiento en nuestro laboratorio. Se recurrió a la PCR cuantitativa o en tiempo real para determinar tanto la carga viral como la relación del estado episomal versus integrado del genoma viral dentro del genoma celular. Además se utilizó la PCR específica de sitio de restricción para aislar las secuencias flanqueantes al genoma viral integrado en el genoma celular.*

Resultados: *Los resultados obtenidos muestran que a medida que aumenta la carga viral, también aumenta el grado de las lesiones. En un 45% de los casos (9/20) se encontró que la ruptura más frecuente en el gen E2 del genoma viral está en su región correspondiente al extremo carboxilo terminal. Las secuencias obtenidas se compararon en la base de datos de “BLAST” del NCBI, y se encontró que el sitio de inserción no corresponde a secuencias antes reportadas.*

Discusión: *La asociación revelada entre carga viral y el grado de lesión coincide con los hallazgos de J. L. K. Cheung y colaboradores⁵⁶, pero a diferencia de estos que demostraron que los sitios frecuentes de ruptura en el gen E2 eran en sus regiones amino terminal 1 y bisagra, como se dijo arriba, la mayoría de los casos, ocurre en la región carboxilo-terminal. Las secuencias encontradas se pueden deber a que en el momento de integrarse el virus al genoma celular, este puede causar deleciones y complejos rearrreglos en las zonas flanqueantes del sitio de integración generando nuevas secuencias, como lo describen E. C. Thorland y colaboradores⁴⁸.*

Conclusiones: *Se logró caracterizar el estado del genoma viral en las muestras de ADN estudiadas, por lo que ahora se cuenta con una pieza más de información que permitirá un mejor entendimiento y por ende mayor prevención de éste grave problema de salud pública.*

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Importancia del CaCU.

El CaCU es uno de los principales problemas de salud de las mujeres en el mundo. Cada año son diagnosticadas más de 500,000 mujeres con esta enfermedad, de las cuales llegan a morir casi las dos terceras partes. En México, esta enfermedad es la segunda causa de defunción por neoplasias malignas de mujeres entre los 25 y los 64 años de edad, con aproximadamente 6,000 decesos anuales. Ello equivale a que cada dos horas pierde la vida una mexicana a causa de este padecimiento¹. Aunque la incidencia del CaCU varía entre los distintos grupos poblacionales, la mayor mortalidad la sufren los países en vías de desarrollo, en los que la conjunción de factores sociales, políticos, culturales y económicos, sumados al inadecuado registro y a un pobre conocimiento de la enfermedad, la han convertido en un problema muy grave de salud pública². El CaCU es una enfermedad altamente prevenible y tratable, ya que pueden transcurrir de 5 a 10 años para que una lesión pre-cancerosa evolucione a un tumor³. Ello brinda un área de oportunidad importante, para realizar el diagnóstico antes de que ocurra la progresión natural de la enfermedad hacia estudios intratables.

1.2 Cáncer Cervico-Uterino.

La clasificación de las etapas clínicas de la evolución del carcinoma de cuello, partiendo de la etapa cero, que correspondería al carcinoma in situ⁴, son:

- *Estadio I: confinado al cuello del útero.*
- *Estadio II: se extiende más allá del cuello, pero no se extiende a la pared de la pelvis; afecta a la vagina en su parte superior sin afectar el tercio inferior.*
- *Estadio III: el carcinoma se extiende a la pared pelviana; en la exploración al tacto rectal no existe espacio entre el tumor y la pared pelviana; el tumor se extiende además al tercio inferior de la vagina.*
- *Estadio IV: puede infiltrar la pared de la vejiga urinaria o el recto; esta forma incluye diseminación con metástasis.*

El pronóstico y la supervivencia para los carcinomas invasivos dependen en primer lugar del estadio en el que se detecta el cáncer, y en menor medida al tipo celular predominante en el tumor.

Este proceso de transformación neoplásica toma varios años. Por ejemplo, el cambio de un epitelio normal a cáncer in situ puede llevarse a cabo en cinco años y la evolución a cáncer invasor hasta diez⁵.

1.2.1 Etiología.

Existen diversos factores de riesgo para el CaCU, dentro de los cuales se ha encontrado que el más importante es la infección persistente con el virus del papiloma humano o VPH, como fué postulado en 1976 por Harald zur Hausen⁶. Sin embargo se ha establecido que aunque la presencia del virus es necesaria, ello no es suficiente para el desarrollo de la neoplasia⁷. El VPH se encuentra en al menos el 20% de mujeres asintomáticas, la mayoría de las cuales lo eliminan⁸. A su vez, en un 99.7% de los casos de CaCU invasivo⁹. Por lo anterior, es claro que otros factores o co-factores definen el destino de la infección, entre los que se encuentran: la promiscuidad¹⁰, la edad (siendo más frecuente en mujeres jóvenes con actividad sexual)¹¹, la paridad (presentando un riesgo mayor de 3.8 en mujeres con 7 u 8 hijos)¹², el uso prolongado de anticonceptivos (que pueden aumentar hasta 4 veces el riesgo de CaCU en mujeres infectadas por el VPH)¹³, el tabaquismo (que duplica el riesgo de cáncer en las fumadoras)¹⁴, el consumo de suplementos alimenticios como los folatos¹⁵, la crianza en un medio de recursos limitados¹⁶, así como el componente genético. En este último, se han considerado mutaciones en los genes supresores de tumores como p53 y pRb, así como una disminución en la cantidad y funcionalidad de las células pro-inflamatorias¹⁷.

Además de a estos co-factores ambientales, últimamente se han reenfocado los estudios al estatus del genoma viral, lo que podría estar relacionado de una manera mas directa con el desarrollo del CaCU. Entro los que más se destacan están: 1) la carga viral, ya que se ha observado que ha medida que la enfermedad progresa de una lesión de bajo grado (LIEBG) a una de alto grado (LIEAG) y más tarde a cáncer invasivo, el virus se encontrará en una mayor cantidad en esta última. Así mismo, se ha observado que la mayoría de las infecciones se resuelven esporádicamente, pero en

los casos de que se trate de un VPH de alto riesgo oncogénico y sea éste persistente, es posible que estas progresen a lesiones cancerosas (véase figura 1). Además de la carga viral, se le ha dado importancia al estado en el que el virus se pueda encontrar, ya sea de forma episomal (como se encuentra normalmente al inicio de la infección), o de manera integrada en el genoma celular. En este último caso viéndose afectados genes importantes para la proliferación celular, regulación celular y el proceso de apoptosis, destacándose las alteraciones en ésta como importantes biomarcadores para la predicción de la progresión a CaCU.



Figura 1. Evolución de la infección causada por el VPH. Se sabe que más del 70% de las adolescentes sexualmente activas y mujeres jóvenes adquieren una infección por VPH. Sin embargo la mayoría son transitorias y únicamente alrededor del 25% desarrollará una lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG). Después, sólo del 20 al 40% de éstas progresarán a lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG), lo cual significa que del 5 al 10% de las mujeres que adquieren la infección por el virus desarrollarán una LIEAG.

1.2.2 Virus del Papiloma Humano.

El VPH pertenece a la familia de Papillomaviridae, cuyos miembros poseen cápside icosaédrica, genoma circular de ADN de doble cadena de alrededor de 8Kb asociado a histonas y un diámetro de la partícula viral de entre 52 y 55nm¹⁸ (figura 2). Este virus infecta exclusivamente células epiteliales de la mucosa y/o epidermis con capacidad proliferativa¹⁹ y se caracteriza por permanecer asociado al huésped por largos periodos de tiempo.

Existen más de 100 diferentes tipos de VPH²⁰. La mayoría de los cuales no causan síntomas ni signos y desaparecen sin tratamiento. Sin embargo, ciertos tipos de VPH causan verrugas comunes en las extremidades y existen alrededor de 30 tipos de VPH que son los que afectan el área genital. De acuerdo a su capacidad para desarrollar lesiones intraepiteliales y/o CaCU (capacidad oncogénica), todos estos tipos virales se dividen en dos grupos: de bajo y de alto riesgo. El grupo de alto riesgo (VPHs oncogénicos) está constituido principalmente por los tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 56, 58 y 68²¹; y dentro del grupo de bajo riesgo se encuentran los tipos 6, 11, 40, 42, 43 y 44²².

El genoma de VPH se divide en tres regiones: 1) genes de expresión temprana (E1 a E8) dentro de los que destacan los oncogenes (los cuales difieren según el tipo viral) los cuales modulan el proceso de apoptosis y transformación descontrolada del ciclo celular: E6 que degrada a la proteína p53, E7 que degrada a la proteína pRb y E2 que esta implicado en la regulación de la transcripción de los oncogenes y la replicación viral. 2) genes de expresión tardía, que codifican para proteínas de la cápside (L1 y L2) y 3), la región de control larga o LCR que esta constituida por el origen de replicación, la región promotora y una secuencia que controla la transcripción de los genes virales (figura 2).

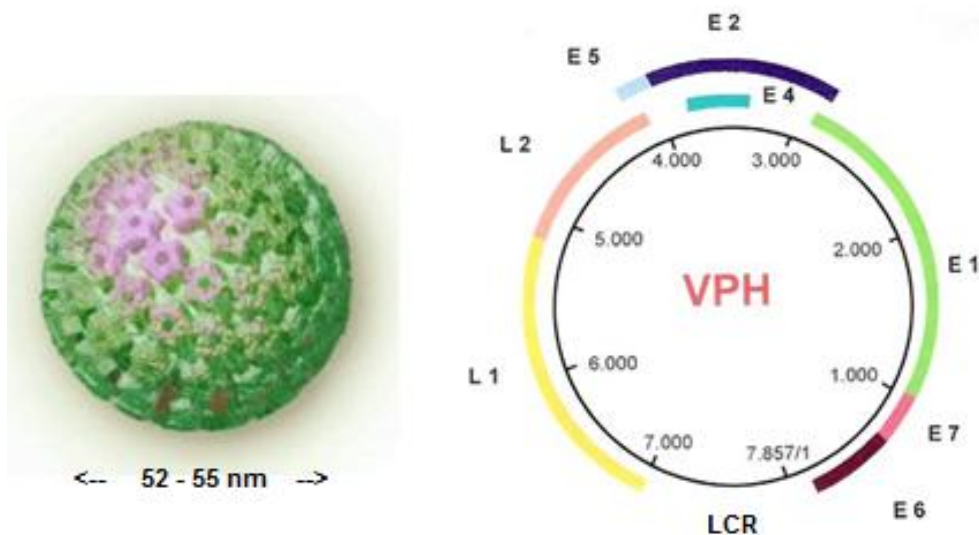


Figura 2. El VPH y su estructura molecular. Apariencia de la cápside viral (izquierda) y la representación del genoma viral (derecha) y su composición génica.

1.3 Carga Viral.

La modificación de los marcadores virales como la infección, persistencia y expresión oncogénicas (generalmente en aumento), se puede interpretar como el efecto de un desequilibrio en la interacción entre el virus y el anfitrión: una capacidad replicativa creciente del virus contra una efectividad reducida de controlarle por parte del sistema inmune de la mujer infectada. Particularmente, el escape a los mecanismos de control del hospedero sobre el proceso viral (de la infección al desarrollo de la lesión) en los niveles adicionales e intracelulares, se ha reconocido como un paso crítico en la evolución de la infección benigna y transitoria hacia la transformación cancerosa de las células infectadas²³.

Otro parámetro a considerar es la carga viral, en donde existen algunos estudios que han evaluado su asociación con la evolución de las infecciones hacia displasias y cáncer in situ^{24, 25}. De hecho, se ha reportado que las mujeres con citología normal, pero con carga viral alta del virus del tipo 16, corren un riesgo elevado de desarrollar neoplasias malignas intracervicales (NIC); sobre todo si la carga viral alta persiste a través del tiempo²⁶. Una asociación de esta naturaleza se ha demostrado para los VPHs de los tipos 31, 33, 52 y 58, que pertenecen al mismo agrupamiento filogenético²⁷. En cambio, los VPHs de los tipos 18, 45 y 35 con cargas virales equivalentes a las de los otros tipos virales, aunque estén asociadas al desarrollo de un fenotipo transformado, demuestran generalmente una actividad replicativa más baja y un rango dinámico más estrecho²⁸, evidenciando que esta observación apunta a la evaluación de la abundancia del VPH como un marcador de riesgo tipo-dependiente. Además de la carga viral per se, también debe tomarse en cuenta la edad de la paciente, esta es la variable epidemiológica más importante a considerar, pues las cargas virales en mujeres más jóvenes tienden a ser más altas, debido a infecciones nuevamente adquiridas y a la ausencia de control inmune específico, inducido por el contacto previo con el virus.

1.4 Integración Viral en el genoma huésped.

El ADN viral puede encontrarse en la célula infectada de tres maneras: completamente integrado al genoma celular (forma integrada), libre en el núcleo celular (forma episomal) y tanto en la forma integrada como en la episomal (forma mixta).

El fenómeno de integración del genoma viral en el de la célula infectada parece estar más involucrado en la transformación de éstas hacia células malignas y la progresión de lesiones intraepiteliales a carcinomas invasivos del cuello uterino. En donde se ha observado que la frecuencia de formas integradas o al menos mixtas y aumenta con la progresión de la enfermedad²⁹. De esta manera, la transición de lesiones intraepiteliales de alto grado (LIEAG) a carcinomas microinvasivos (mCA) se caracteriza por la integración del genoma viral de tipos virales de alto riesgo³⁰.

Estos eventos de integración, especialmente del VPH del tipo 16, se dan vía el rompimiento del genoma viral, principalmente en su región E1/E2, interrumpiendo la secuencia de estos reguladores génicos y permitiendo que exista desregulación que conduce a la sobreexpresión de los oncogenes virales E6 y E7, cuyos productos son los que inactivan genes celulares supresores de tumores, como p53 y pRb, los que a su vez son los responsables del control en importantes puntos de verificación del ciclo celular³¹.

Sin embargo, la ausencia de integración del VPH 16 en algunos estados clínicos avanzados como NIC III o carcinoma in situ (CIS), sugiere que la integración no es siempre requerida para la progresión maligna de lesiones del cuello uterino^{32, 33}.

En lesiones provocadas por el VPH tipo 16 se han identificado diferentes patrones de ruptura del genoma viral, considerándose que la región viral correspondiente a los genes E1 y E2 es la que más frecuentemente sufre el rompimiento. Sin embargo, dentro de esta región a su vez existen varias subregiones específicas que han sido reconocidas como blancos de rompimiento viral, tanto en E1^{34, 35}, como en E2^{36, 37}.

1.4.1 Descripción de E2.

Teniendo en cuenta que frecuentemente ocurren rupturas o deleciones a nivel de la región de E2, parte de los efectos de la integración viral van a depender de la alteración de las funciones biológicas de este gen.

El producto del gen E2 es una proteína nuclear de 45KDa que presenta tres dominios funcionales:

- 1) El extremo amino terminal de activación (E2TAD), responsable de regular la transcripción y la replicación del ADN viral. Promueve la oligomerización e interacción entre moléculas de E2 unidas al ADN en sitios distantes, provocando una curvatura en la molécula de ADN y otros cambios conformacionales³⁸.
- 2) Dominio de la bisagra o dominio central. Esta es la región de longitud y secuencia más variables entre los VPHs. Es importante para la función de E2 durante la transcripción y replicación viral, además de que le da estabilidad al complejo E2 - ADN.
- 3) El extremo carboxilo terminal de dimerización y unión al ADN, el cual se une al palíndromo de 12pb ACCgNNNN-cGGT, llamado sitio de unión a E2 (E2BS).

- Las letras en minúsculas son las bases preferenciales pero no requeridas para la unión al ADN.
- La región NNNN se llama espaciadora, su longitud está conservada entre los VPHs, pero la secuencia varía con el tipo viral.

El genoma de los VPHs de alto riesgo contiene cuatro sitios E2BS ubicados en la LCR, que se hallan hacia el extremo 5' del promotor viral que regula la expresión de los genes tempranos. La unión de E2 al ADN provoca la represión de este promotor y la activación de la replicación viral. A su vez, estas funciones dependen de la concentración intracelular de E2, además de la unión a cuatro existentes. A saber:

- BS1. Interfiere con la unión de TBP (proteína de unión a la caja TATA), además de afectar la estabilidad del complejo de pre-inicio de la transcripción.
- BS2 y BS3. Contribuye a la represión del promotor compitiendo con factores de transcripción como SP1.
- BS3. Es necesaria para la replicación viral.
- BS4. Además de ser el sitio mas afín para E2, regula positivamente la expresión génica (figura 3).

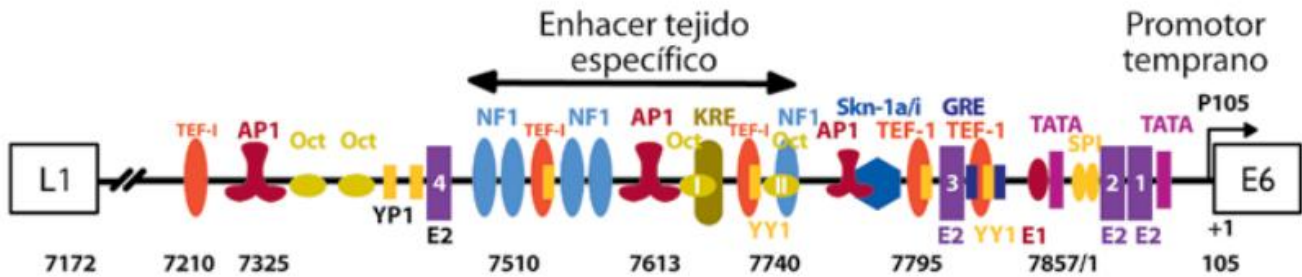


Figura 3. Conformación de la región de control larga del VPH de alto riesgo. La LCR contiene numerosos elementos de respuesta en cis que gobiernan la expresión génica y la expresión viral. Los factores celulares y virales pueden llegar a interactuar con esta región, como las proteínas E1 y E2, que modulan la actividad transcripcional y la replicación del virus

E2 también tiene una función anti-proliferativa, pues puede reprimir el crecimiento e inducir apoptosis, en parte mediante la represión de la transcripción de E6 y E7, así como por el consecuente aumento de p53³⁹.

1.4.2 Ruptura de E2.

Aunque al inicio de las infecciones por VPH el genoma viral existe como un elemento extracromosomal en células pre-neoplásicas, frecuentemente se integra al genoma del huésped en las lesiones cervicales⁴⁰. Como se mencionó anteriormente, la integración cromosomal por lo general resulta en la ruptura del marco abierto de lectura del gen E2, con la consecuente pérdida de su proteína⁴¹. Se ha argumentado que la ruptura del gen E2 guiará a la desregulación del ciclo celular y de las vías de diferenciación celular y finalmente a la transformación del fenotipo (véase figura 4). Además, se ha observado que otro sitio de ruptura común se da en el gen de L1, lo cual fue encontrado en líneas celulares derivadas de cáncer de cérvix invasivo⁴².

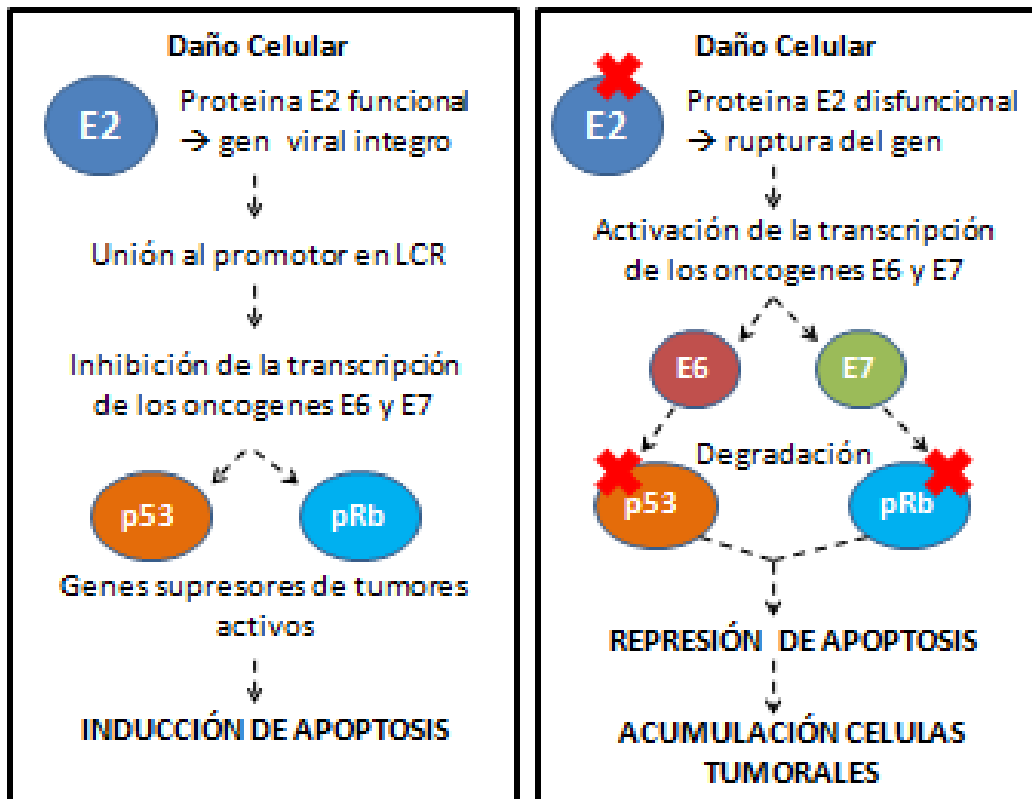


Figura 4. Interacción entre proteínas virales y proteínas celulares involucradas en el ciclo celular. Cuando el VPH infecta una célula y se encuentra de forma episomal, el gen E2 será funcional, el cual inhibirá la transcripción de los oncogenes E6 y E7 por la unión específica a sitios en el promotor de la LCR, activándose la inducción de apoptosis por medio de la intervención de los genes supresores de tumores p53 y pRb (izquierda). Sí el VPH se encuentra de forma integrada, el gen E2 ya no será funcional (debido a su ruptura), lo que permitirá la transcripción y traducción activa de los oncogenes E6 y E7, cuyos productos a su vez se unirán y degradarán a las proteínas supresoras de tumor p53 y pRb respectivamente, guiando a la acumulación de células tumorales debido a la represión de apoptosis (derecha).

Otras consecuencias de la pérdida de la actividad represora de E2 son el aumento en la capacidad de inmortalización⁴³, el incremento en la estabilidad de los RNA mensajeros de E6 y E7⁴⁴ y la alteración del perfil de expresión de varios genes celulares⁴⁵. Igualmente, la expresión de E6 y E7 a partir de secuencias integradas confiere a las células infectadas ventajas selectivas de crecimiento⁴⁶.

1.5 Sitios de Integración celular.

El proceso de inserción viral no sólo afecta la estructura del genoma viral, sino también a los genes celulares del hospedero interrumpidos durante la integración. Actualmente se han identificado más de 230 sitios de integración celular, existiendo la hipótesis de que la integración viral ocurre de forma aleatoria a lo largo del genoma, aunque un alto porcentaje de éstos sitios corresponden a los CFS (Common Fragil Sites) o regiones genómicas altamente susceptibles a la ruptura, las cuales facilitan la inserción de ADN exógeno. La mayoría de los casos de inserciones estudiadas corresponden a VPHs del tipo viral 16, descritos en tumores primarios de cuello uterino y líneas celulares⁴⁷⁻⁵². La integración en CFSs esta comúnmente asociada con grandes deleciones cromosomales y re-arreglos, por tanto, cualquier gen o grupo de genes presentes en estas regiones podrían sufrir este tipo de alteraciones después de la integración de las secuencias virales⁴⁷.

También se ha observado integración del genoma viral o porción de éste en genes involucrados con el desarrollo de tumores, como: MYC⁵⁴, que es un factor de transcripción que regula la expresión de aproximadamente el 15% de todos los genes; TP63, que es un gen supresor de tumores perteneciente a la familia de p53; hTERT, que codifica para la transcriptasa reversa de la DNA telomerasa, entre otros. A pesar de que en el proceso de integración es más probable que sean interrumpidas las regiones intrónicas que las exónicas, la estructura de los mensajeros de los genes donde se inserta el genoma viral y por ende la síntesis de las proteínas por ellos codificados, se altera significativamente.

En general, existe evidencia experimental limitada relacionando la integración viral con la alteración de la actividad biológica de los genes celulares afectados y por tanto, no es clara la contribución de estas modificaciones celulares en el desarrollo del fenotipo maligno. No obstante, se cree que solamente algunas integraciones específicas podrían alterar los genes celulares allanados por la integración o los de sus alrededores. Este fenómeno junto con la carga viral y el aumento del nivel de transcritos de oncoproteínas virales mediado por E2, contribuiría conjuntamente en el desarrollo de tumores del cuello uterino.

En México se han realizado diversos estudios sobre CaCU, algunos de tipo descriptivo y otros de casos y controles, enfocándose al estudio de los factores de riesgo asociados a la progresión de las lesiones pre-malignas hacia malignas. Otros más han evaluado las variantes y sub-variantes de VPH en la población mexicana. Estos estudios han ampliado el conocimiento en el área, pero hasta el momento no se investigado en conjunto la carga viral, la integración viral y el sitio de ésta, en función del grado de evolución en la lesión. Por este motivo, es necesario implementar nuevas técnicas de disección del estado del genoma viral en el núcleo de las células infectadas de mujeres positivas para el VPH.

CAPITULO II

JUSTIFICACIÓN

Para enfrentar mejor el grave problema de salud pública que en México representa el cáncer cervicouterino (CaCU), se requiere no solo utilizar los métodos clínicos actuales, sino perfeccionar técnicas que permitan revelar el estado del genoma viral en las células de las mujeres afectadas, para lograr un diagnóstico y tratamiento mas tempranos, incluido el seguimiento de la evolución de la enfermedad, para evitar que progrese a CaCU.

CAPITULO III

HIPÓTESIS

La carga, la integración viral, así como el sitio de ésta en el genoma celular son factores importantes en el desarrollo de lesiones intraepiteliales y de cáncer cervicouterino y tendrán variaciones de acuerdo a la etapa de las lesiones

CAPÍTULO IV

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Analizar y comparar el estado del genoma del Virus del Papiloma Humano (número de copias, grado de integración y sitios de ésta) en mujeres infectadas con lesiones intraepiteliales versus aquellas con tumores cervicales.

4.2 Objetivos específicos.

- a. Seleccionar muestras de ADN del Biobanco de la UBM de pacientes previamente estudiadas y que resultaron positivas para el VPH 16 para determinar la carga viral presente en cada una de ellas.*
- b. Determinar el cociente del virus integrado versus el episomal en las muestras.*
- c. Identificar los sitios de integración del genoma viral en el genoma huésped.*

CAPITULO V

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Lugar de realización del estudio

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Genómica y Bioinformática y en la Unidad de Diagnóstico Molecular, del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la UANL.

5.2 Grupo de Estudio.

Se partió de una cohorte de 376 pacientes VPH positivas con un resultado anormal en su citología, las cuales pertenecen a uno de los tres grupos de la línea de investigación de Cáncer Cervico-Uterino del referido Laboratorio de Genómica y Bioinformática (la tipificación se realizó en dicho laboratorio y los bioespecímenes se almacenaron en el Biobanco de la referida Unidad), los grupos se dividen en: “general”, “lesiones” y “tumores”.

5.3 Materiales

5.3.1 Consumibles

Las puntillas para las micropipetas y los microtubos utilizados fueron de la marca Axygen, Inc. (Union City, CA, E.U.A.).

Para PCR en tiempo real fueron utilizadas placas ópticas de 96 pozos MicroAmp de Applied Biosystems (Foster City, CA, E.U.A.).

5.3.2 Reactivos

Los reactivos de PCR en tiempo real como el TaqMan Universal Master Mix II with UNG, TaqMan β -actin Detection Reagents, TaqMan GAPDH Detection Reagents y Custom TaqMan Gene Expression Assay provinieron de la compañía de Applied Biosystem (Foster City, CA, E.U.A.).

Para la purificación de DNA plasmídico se utilizó el kit Plasmid Purification de QIAGEN (Valencia, CA, E.U.A).

Para la PCR convencional se utilizó el MgCl₂, el amortiguador 10X del estuche de Fermentas International Inc.(Burlington, ON, Canadá), los dNTPs de New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA, E.U.A), y los oligonucleótidos sintetizados por Invitrogen (Carlsbad, CA, E.U.A.).

Para llevar a cabo la clonación se utilizó el estuche TOPO XL PCR cloning Kit por invitrogen (Carlsbad, CA, E.U.A), distribuidos por Accesolab (Delegación Cuajimalpa, México D.F.)

Para la secuenciación se utilizó el estuche BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystem (Foster City, CA, E.U.A).

La agarosa empleada en las electroforesis procedió de Invitrogen (Carlsbad, CA, E.U.A).

5.3.3 Material biológico

Se utilizaron 20 muestras de ADN extraído de células cérvix de pacientes previamente identificadas como positivas para VPH 16 y que presentaban un resultado anormal en su citología. Además se utilizaron plásmidos construidos previamente en el laboratorio y que contienen 3000 y 5000 pb del genoma del VPH 16⁵³.

5.3.4 Equipo

Se utilizaron los siguientes equipos: micropipetas Eppendorf Research y la centrifuga modelo 5415 C de la compañía Eppendorf AG (Hamburgo, Alemania). Centrifuga Labnet modelo Spectrafuge 24D (Edison, NJ, E.U.A), balanza analítica Adventurer SL de Ohaus (Pine Brook, NJ, E.U.A), horno de microondas Gold Star modelo MA-875M, Abi Prism 7300 Real-Time PCR system de Applied Biosystems (Foster City, CA, E.U.A), StepOne Real-Time PCR system de Applied Biosystem

(Foster City, CA, E.U.A), Vortex modelo 37600 Thermolyne (Dubuque, IA, E.U.A), Termociclador Veriti 96-well thermal cycler de Applied Biosystem (Foster City, CA, E.U.A), cámara de electroforésis horizontal Owl modelo B2 de Thermo Fisher Scientific, Inc. (Waltham, MA, E.U.A), fuente de poder Gibco BRL 500 (Gaithersburg, MD, E.U.A) y el fotodocumentador modelo Avebury House 36^a de UVITEC (Union Lane, CB, UK).

5.3.5 Programas Computacionales

Los programas de análisis de Biología Molecular utilizados fueron: Amplify versión 3X (University of Wisconsin, WI, E.U.A), OLIGO versión 6.4 (1989-2000 Wojciech Rychlik, Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO, E.U.A), Chromas Lite versión 2.01 (1998-2005 Technelysium Pty Ltd), Vector NTI Suite 9 (1994-2000 Informax, The University of North Carolina Shared Bioinformatics Resources). Además, los programas: NEBcutter 2.0 de New England Biolabs, Clustal W y BLAST, disponibles en internet.

5.4 Métodos

5.4.1 Estrategia General

La estrategia experimental que se llevó a cabo se representa en la figura 5:

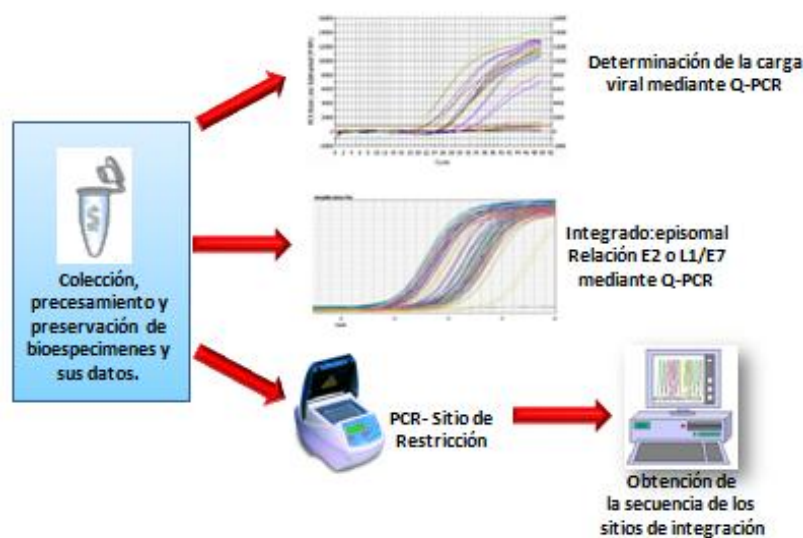


Figura 5. Estrategia general de la tesis. Una vez obtenidas las muestras de las 20 pacientes positivas para VPH 16 previamente procesadas, genotipadas, identificadas y resguardadas, se prosiguió a la determinación de la carga viral y la obtención del coeficiente de integración versus episomal por medio de PCR en tiempo real, así como también la determinación del sitio de integración en el genoma celular a través de PCR punto final y secuenciación.

5.4.2 Amplificación y clonación del exón 3 del gen de la β -actina (gen para normalizar la carga viral).

El exón 3 del gen de la β -actina fue amplificado por PCR utilizando el par de iniciadores provistos en el kit de detección de β -actina de TaqMan®, a partir de ADN control proporcionado por dicho kit y siguiendo las condiciones recomendadas por el proveedor⁵⁵. Una vez obtenido el producto de PCR, se clonó en el Vector comercial TOPO XL de Invitrogen. La reacción de clonación se realizó en un microtubo estéril utilizando 4 μ L del producto de PCR y 1 μ L de TOPO XL para un volumen final de 5 mL, incluyendo como control negativo buffer TE 1X. La mezcla se agitó suavemente y se incubó por 5 min a TA (~25°C). Para detener la reacción se agregó 1 μ L de 6X TOPO Cloning Stop Solution, se mezcló por varios segundos a TA, se centrifugó y se colocó en hielo. Una vez hecho esto se transfirieron 2 mL de la reacción de clonación (TOPO Cloning reaction) o 10 ng del producto (en un volumen de 20 mL), a un vial de bacterias electrocompetentes TOP10 Electrocomp™ E. coli. Se agitó suavemente y se transfirió a una celda de electroporación (previamente enfriada) sin formar burbujas. Luego se colocó la celda en el electroporador y se dió el pulso a 2.54 kVolts, 200 ohms y 25 μ s. Al terminar se sembraron las bacterias en placas con medio LB (Luria Bertani) utilizando kanamicina como antibiótico de selección.

5.4.3 Amplificación y clonación del un fragmento del gen de GAPDH (gen opcional para normalizar la carga viral)

El fragmento de GAPDH fue amplificado por PCR utilizando el par de iniciadores provistos en el kit de detección de GAPDH de TaqMan®, a partir de ADN control. Una vez obtenido el producto de PCR, se prosiguió con su clonación en el Vector comercial TOPO XL de Invitrogen. La reacción se llevó a cabo como se menciona previamente.

5.4.4 Curva Estándar para los genes de normalización de los ensayos de PCR en tiempo real

A partir de las construcciones con el gen de β -actina y el gen GAPDH se hicieron diluciones seriadas para obtener de 10 a 100,000 copias a partir de sus concentraciones iniciales, siguiendo los cálculos como se muestra en los cuadros 1 y 2.

Cuadro 1. Cálculos para obtener el número de copias requerido para la curva de calibración por PCR en tiempo real.

$$m = \left[n \right] \left(\frac{1.096 \times 10^{-21} \text{ g}}{\text{bp}} \right)$$

En donde: n = tamaño del plásmido (pb)

m = masa

# de copias		Masa del plásmido
100000	$m = 4.186 \times 10^{-18}$	4.186×10^{-13}
10000		4.186×10^{-14}
1000		4.186×10^{-15}
100		4.186×10^{-16}
10		4.186×10^{-17}

Cuadro 2. Continuación de los cálculos para obtener el número de copias de un plásmido.

# de copias	Masa del plásmido (gramos)	Cantidad de μL por reacción	[Final del plásmido] ADN (gramos)
100000	4.186×10^{-13}	5	8.371×10^{-14}
10000	4.186×10^{-14}		8.371×10^{-15}
1000	4.186×10^{-15}		8.371×10^{-16}
100	4.186×10^{-16}		8.371×10^{-17}
10	4.186×10^{-17}		8.371×10^{-18}

Dilución	Concentración inicial (g/μL) C1	Volumen del plásmido (μL) V1	Volumen del diluyente (μL)	Volumen Final (μL) V2	Concentración Final (g/μL) C2	# de copias del plásmido
Stock	7.81E-08	10	990	1000	7.81E-10	N/A
Dilución 1	7.81E-10	10	990	1000	7.81E-12	N/A
Dilución 2	7.81E-12	1.07	98.93	100	8.37E-14	100000
Dilución 3	8.37E-14	10	90	100	8.37E-15	10000
Dilución 4	8.37E-15	10	90	100	8.37E-16	1000
Dilución 5	8.37E-16	10	90	100	8.37E-17	100
Dilución 6	8.37E-17	10	90	100	8.37E-18	10

Una vez obtenidas las preparaciones con el número de copias requerido, se prosiguió a amplificar cada una de las preparaciones por medio de PCR en Tiempo Real, siguiendo el programa estándar señalado en el cuadro 3⁵⁵, para la posterior obtención tanto de la ecuación de la recta, como de la R^2 (factor de correlación), las cuales servirían para la cuantificación absoluta del número de copias de las muestras.

Cuadro 3. Programa estándar de amplificación para PCR Tiempo Real, utilizando sondas TaqMan.

Paso	Incubación con Uracil-N-glicosilasa (UNG)	Activación de la enzima AmpliTaq Gold	PCR	
	<i>Retener</i>	<i>Retener</i>	<i>40 Ciclos</i>	
			<i>Desnaturalizar</i>	<i>Alineamiento/ Extensión</i>
Temperatura	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C
Tiempo	2min	10min	15s	1min
Volumen	50μL			

5.4.5 Re-caracterización del plásmido “VPH16MY11-CPI+TOPOXL 3k”

Se re-caracterizó un plásmido almacenado en el Biobanco que esta compuesto por un fragmento de 3Kb del VPH 16 que va del gen L1 a E1 (comprendiendo a los genes L1, E1, E6, E7 y la región de control larga) clonado en el Vector comercial TOPO

XL. Para la caracterización se utilizaron las endonucleasas de restricción DraIII, PstI y EcoRI y se corroboró el patrón de bandas esperado.

5.4.6 Curva Estándar para el gen E7

A partir de las construcciones del plásmido con las 3Kb (en donde se encuentra el gen viral E7) se hicieron diluciones seriadas para obtener de 10 a 10, 000,000 copias a partir de sus concentraciones iniciales, amplificando cada una de ellas por medio de PCR en Tiempo Real siguiendo las condiciones del proveedor⁵⁵, para la posterior obtención tanto de la ecuación de la recta como de la R^2 (factor de correlación), parámetros que servirían para la cuantificación absoluta del número de copias de las muestras.

5.4.7 Obtención de la carga viral

Una vez obtenidos las curvas estándares de cada uno de los genes de interés (β -actina y GAPDH), se prosiguió a cuantificar cada una de estas regiones para las muestras, extrapolando los datos obtenidos a las ecuaciones de la recta de cada una de las curvas estándares. Utilizando la siguiente ecuación se obtuvo la carga viral normalizada:

$$\text{Carga Viral} = \left(\frac{\text{número de copias del gen E7}}{\text{Número de copias del gen normalizador}} \right) \times 2$$

5.4.8 Re-caracterización del plásmido “VPH16Af1+1FW-14REV+TOPOXL 5k”

Se re-caracterizó el plásmido que esta compuesto por un fragmento de 5Kb del VPH 16 insertado en el Vector comercial TOPO XL que incluye del gen L1 a E1 (comprendiendo a los genes L1, E1, E2, E5 y L2) y que se encuentra almacenado en el Biobanco. Se utilizaron las enzimas de restricción BamHI, AclI y EcoRI para corroborar el patrón de bandas esperado.

5.4.9 Curva Estándar para el gen E2 y L1

A partir de las construcciones de 5Kb (en donde se encuentran los genes virales E2 y L1) se hicieron diluciones seriadas para obtener de 10 a 10,000,000 copias a partir de sus concentraciones iniciales. Se amplificaron por medio de PCR en Tiempo Real cada una de las regiones elegidas para el gen de E2 (figura 6), a fin de obtener tanto la ecuación de la recta como de la R^2 (factor de correlación), las cuales servirían para la cuantificación absoluta del número de copias de cada una de las muestras.

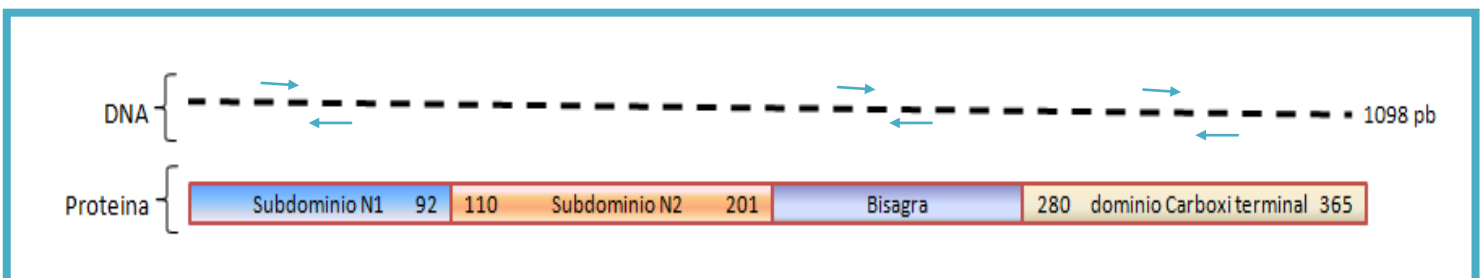


Figura 6. Representación estructural de la proteína del gen E2 del VPH, compuesta por el dominio amino terminal (que a su vez se divide en subdominio N1 y N2), bisagra y el dominio carboxilo terminal. Además se muestra en la representación del DNA los sitios elegidos para la amplificación por PCR en tiempo real, para cada una de las regiones del gen E2.

5.4.10 Obtención del cociente integrado vs episomal

Una vez que se obtuvo el número de copias para cada región de E2 y L1 de las muestras, éstas se compararon con el número de copias de E7 (el cual es un gen de referencia para la detección de integración, ya que éste siempre se encontrará de forma íntegra). Para determinar el cociente que se muestra en el cuadro 4, se divide el número de copias de forma logarítmica en base diez del gen E2 o L1 entre el número de copias de forma logarítmica en base 10 del gen E7, en donde si se obtiene un resultado de 0 significa que el genoma viral se encuentra completamente integrado, si se tiene 1 significa que el genoma se encuentra de forma episomal y si la razón es entre 1 y 0 (p. ej. 0.5) significa que el genoma viral se encuentra tanto integrado como episomal.

Cuadro 4. Determinación del cociente de integración, a través de la comparación de las regiones del gen E2 o L1 contra E7.

Relación	Resultado de la relación	Estado Viral
E2/E7	0	<i>Genoma Viral Integrado</i>
o	1	<i>Genoma Viral Episomal</i>
L1/E7	0-1	<i>Combinado</i>

5.4.11 Diseño de iniciadores para encontrar el sitio de integración viral.

Para diseñar los oligonucleótidos (cuadro 5), se utilizaron los programas Oligo 6.4, Amplify 3X y Vector NTI Suite 9. Se partió de la estructura del probable reacomodamiento del virus obtenida al romperse por el gen E2, en donde los iniciadores utilizados se diseñaron en zonas adyacentes a esta ruptura (E1 y L2).

Cuadro 5. Secuencia de los iniciadores utilizados en el estudio.

Nombre	Secuencia	
L2-1	5' TCAACGACTAATGGGGG 3'	<i>Localizado en el gen L2</i>
L2-2	5' ATATAGCCTGTGCGTCC 3'	<i>Anidado al iniciador L2-1</i>
RSO-Taq	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNTCGA 3'	<i>Iniciadores reportados previamente para PCR-SR (referencia)</i>
RSO-Sau	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNGATC 3'	
RSO-Eco	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNGAATTC 3'	
RSO-Bam	5' TAATACGACTCACTATAGGGAGANNNNNNNNNNGGATCC 3'	

5.4.12 Estandarización de la PCR de integración

Para conocer el sitio de integración se utilizó una técnica previamente descrita como PCR-Sitio de Restricción (RS-PCR), en donde se utilizan oligos universales (RSO) basados en secuencias frecuentes de reconocimiento para enzimas de restricción, para secuenciar directamente un fragmento desconocido de ADN, además de utilizar oligos específicos de la región viral (L2-1). Se utilizó el programa de amplificación descrito por Thornland y cols.⁴⁸ (cuadro 6).

Cuadro 6. Programa para la amplificación del sitio de inserción del VPH en el genoma humano.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	3min	1
94	30s	10
45	30s	
68	3min	
94	30s	25
45	30s	
68	3min + 10s/ciclo	
72	10min	1
4	∞	

Condiciones de reacción para la amplificación también descrita por Thornland y cols.⁴⁸ (cuadro 7).

Cuadro 7. Condiciones de la PCR-Sitio de Restricción.

Reactivo	Concentración Final
Oligo específico L2-1	2pM
Oligo RSO	20pM
ADN de cérvix	50ng
PCR Buffer	1X
MgCL ₂	15mM
dNTPs	200μM
Polimerasa	0.5-0.7 U

Para las condiciones de mezcla se utilizaron todos los oligos RSO (Eco, Taq, Sau y Bam). Después de esta PCR, se cortó la banda de amplificación de mayor tamaño del gel de agarosa, ya que debido al uso de oligos inespecíficos que se unen a múltiples secuencias de reconocimiento en el genoma para enzimas de restricción se producen productos amplificados de diversos tamaños. Se purificó el producto amplificado y a éste se le practicó una PCR anidada utilizando el oligo L2-2 y

aumentando la temperatura de alineamiento a 62°C (figura 7), para propiciar la generación de un fragmento único para su secuenciación.



Figura 7. Diagrama de flujo para la obtención del producto para secuenciación. Se muestra el proceso que se llevó a cabo para obtener un fragmento único de PCR para llevar a cabo la secuenciación. Pasando por una primer PCR, el corte y purificación de la banda de interés del gel de electroforesis y la posterior realización de una PCR anidada

5.4.13 Secuenciación del producto de PCR.

Una vez obtenido el producto de PCR, a éste se le hizo una limpieza (exceso de oligos y dNTPs que pudieran interferir con la reacción de secuenciación) agregándole 1µL de EXO (exonucleasa I - 10U/µL) y 1µL de SAP (fosfatasa alcalina de camarón - 1U/µL) dejándose 1hr a 37°C para su activación y 65°C durante 15min para su inactivación. Hecho esto, los reactivos de secuenciación se descongelaron en hielo y en oscuridad y se hicieron los cálculos para la mezcla (cuadro 8).

Cuadro 8. Condiciones de mezcla para la reacción de secuenciación.

Reactivos	Cantidad
Buffer de secuenciación	4 μ L
BigDye Terminator 3.1 Mix	0.5 μ L
Oligo	1 μ L
ADN	100ng
H ₂ O	X*
Volumen total	10

X*= el volumen de H₂O dependerá del volumen en μ L de ADN

Las condiciones de termociclado del programa de la PCR fueron las que se detallan en el cuadro 9.

Cuadro 9. Condiciones utilizadas para la secuenciación en el termociclador.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	3min	1
95°C	15s	28
55°C	10s	
72° C	10min	
4°C	∞	

Una vez finalizada la reacción de secuenciación se colocó el contenido de los tubos de 0.2mL en placas de 96 pozos para proceder a la precipitación del ADN. A cada pozo que contenía muestra se le agregaron 60 μ L de etanol al 95%, 5 μ L de EDTA 125mM y se mezcló en el vortex (delicadamente) para homogenizar, después de lo cual se incubó de 5 a 10min en hielo. Una vez incubado, se centrifugó durante 30min a 3,700rpm. Al terminar se invirtió y pasó la placa con los pozos hacia abajo sobre una toalla de papel, se enderezó y centrifugó durante 10s a 780rpm para eliminar el exceso de líquido, quedando este absorbido en la toalla. Se le agregaron 60 μ L de etanol al 70%, se centrifugó nuevamente durante 15min a 3700rpm y se repitió el proceso de eliminado de exceso de líquido. Se dejó secar durante 10min para eliminar los restos

de etanol y se le agregaron 13 μ L de formamida para proceder a la desnaturalización del producto durante 5min a 95°C. Hecho esto se prosiguió con la secuenciación.

5.4.14 Análisis de los productos de secuenciación

Una vez obtenidas las secuencias arrojadas por el software del secuenciador capilar Genetic Analyzer 3130, se hizo una búsqueda en la base de datos del NCBI para encontrar el sitio en donde se integra el virus. Además se compararon las secuencias en búsqueda de similitudes utilizando el programa computacional Clustal W.

CAPITULO VI. RESULTADOS

6.1 Clonación de los productos de los genes para normalizar resultados

A partir de oligos del kit de detección para los genes de β -actina y GAPDH de sondas TaqMan®, se llevaron a cabo amplificaciones en donde los productos generados fueron verificados en un gel de agarosa al 2%, observándose las bandas esperadas de 300pb para β -actina y 150 para GAPDH (Figura 8)

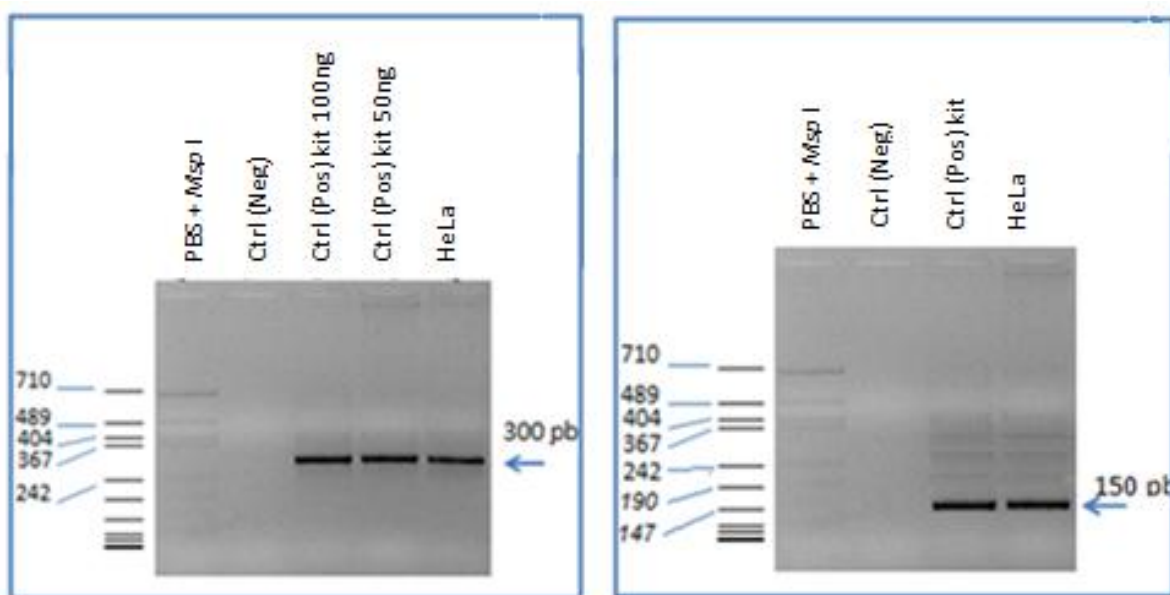


Figura 8. Amplificación de los genes de referencia GAPDH y β -actina para normalizar resultados. A la izquierda se muestra la electroforesis de los amplicones de 300pb del gen de β -actina en el gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se encuentra como marcador de peso molecular el plásmido de pBS digerido con la enzima de restricción MspI (pBS + Msp I); en el segundo carril el control negativo de la PCR [Ctrl (-)], en los siguientes carriles se muestran las amplificaciones a partir de ADN de controles y por último de DNA obtenido de células HeLa (las cuales contienen el genoma del VPH18). Así mismo se muestra a la derecha la electroforesis de los amplicones de 150pb del gen de GAPDH en el gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se encuentra como marcador de peso molecular el plásmido de pBS digerido con la enzima de restricción MspI (pBS + Msp I); en el segundo carril el control negativo de la PCR [Ctrl (-)], en el siguiente carril la amplificación a partir de ADN control y por último la amplificación a partir de DNA de células HeLa (las cuales contienen el genoma del VPH18).

6.2 Clonación de los amplicones en el vector PCR TOPO XL

Una vez que se obtuvieron los productos de interés, se prosiguió a clonarlos en el vector PCR TOPO XL. Las clonas positivas fueron identificadas por selección con antibiótico y corroborados mediante PCR de colonia (figura 9), utilizando los oligos del estuche. La presencia de una banda única de ~300pb se consideró indicativa de que el vector contenía el fragmento del gen de interés.

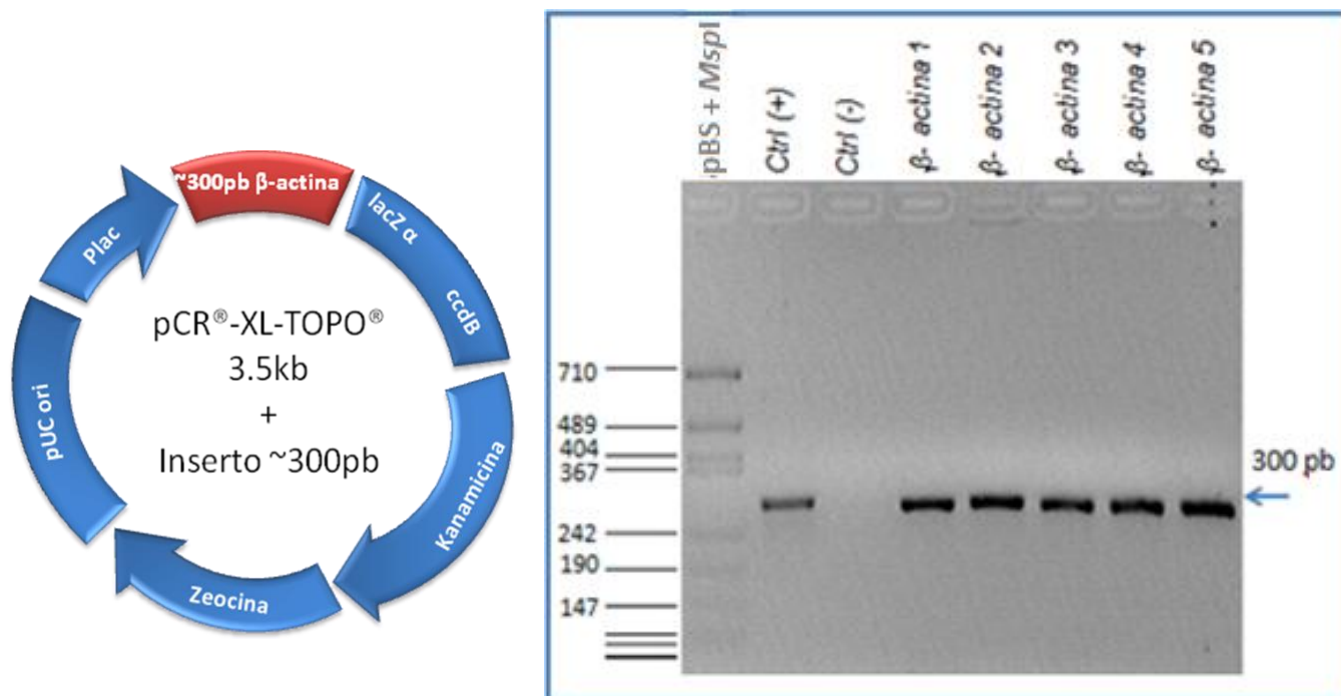


Figura 9. Resultado de la PCR de colonia para un fragmento de ~300pb. A la izquierda se muestra el mapa genético del vector el cual cuenta con un sitio de origen y dos genes de resistencia a antibióticos, de los cuales se utilizó el de Kanamicina para la selección de colonias, así como el fragmento insertado del producto de PCR. Del lado derecho se muestra la electroforesis de los amplicones en el gel de agarosa al 2% y teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se encuentra como marcador de peso molecular el plásmido de pBS, digerido con la enzima de restricción MspI (PBS + MspI); en el segundo carril el control positivo utilizando ADN de células HeLa; en el tercer carril el control negativo y en los siguientes carriles los fragmentos esperada de 300pb para las clonas seleccionadas.

6.3 Curva de calibración de los genes de referencia para normalizar resultados de los ensayos de PCR en tiempo real.

Las clonas que resultaron positivas para el fragmento de interés, se crecieron en medio líquido por medio de selección con el antibiótico kanamicina durante 12 horas

hasta obtener una DO de 4. Una vez alcanzada ésta, se colectaron por centrifugación las bacterias para someterlas a lisis alcalina. El ADN plasmídico obtenido se cuantificó por medio de espectrofotometría, eligiendo la clona 2 debido a los estándares de pureza necesarios (valor de 260/280 de 2) y se preparó haciendo cálculos para realizar las diluciones seriadas en un rango de 100, 000 hasta 10 copias para realizar la curva de calibración por medio de PCR en tiempo real (figura 10).

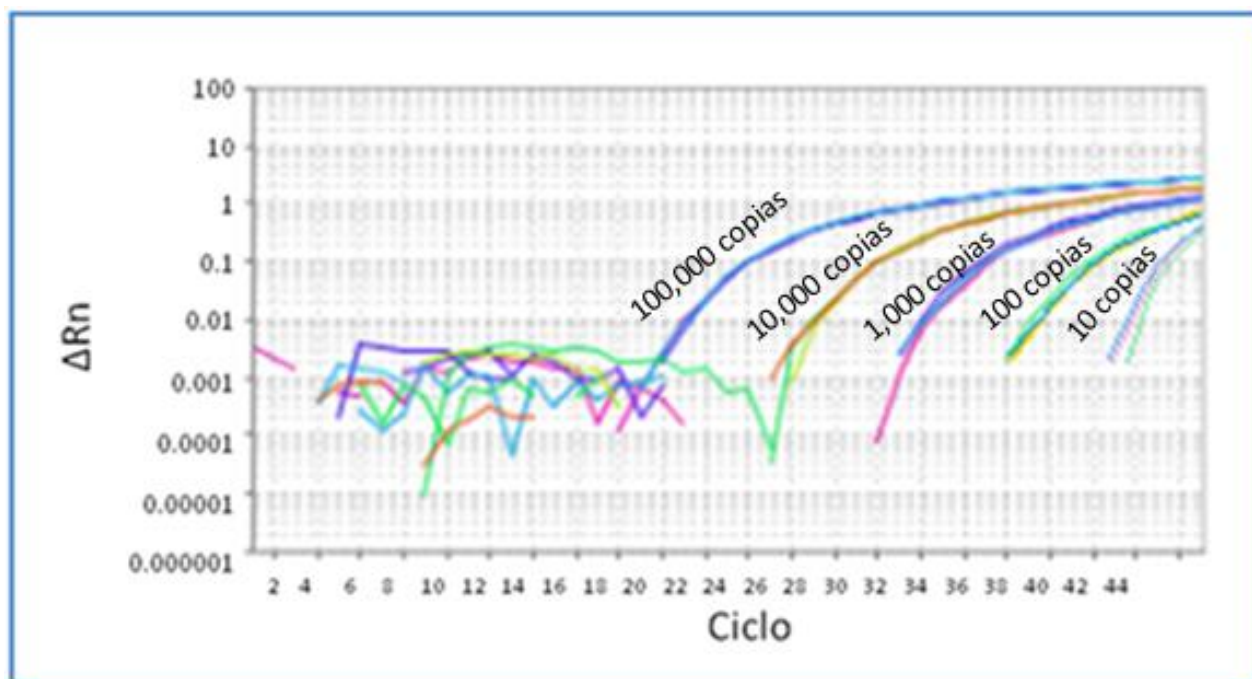


Figura 10. Gráfica de amplificación obtenida del software StepOne. Se muestra una gráfica de amplificación para las diferentes preparaciones con diferentes copias del plásmido con el inserto del gen de β -actina, en donde a mayor número de copias la línea comienza a aparecer en los primeros ciclos de la amplificación. Las amplificaciones se realizaron por triplicado. En la parte inferior se muestran los ciclos en los cuales es detectada la amplificación tras la aparición de fluorescencia emitida por las sondas específicas. Además, en la parte izquierda se muestra la ΔRn , el cual indica la intensidad de fluorescencia de la muestra, misma que es normalizada con la señal del amplicón de referencia.

Los datos obtenidos en las gráficas se muestran en el cuadro 10, tanto para el gen de β -actina como para el de GAPDH, donde se muestra el logaritmo del número de copias y el Ct (refiriéndose al ciclo en el cual se detecta fluorescencia en la fase logarítmica de la reacción debido a la amplificación del producto) para cada uno de

estos genes de referencia, realizándose curvas de calibración y se cuantificando las copias de estos genes en las muestras a través de la ecuación de la recta obtenida.

Cuadro 10. Datos de amplificación de las muestras de referencia para la curva de calibración.

Gen de referencia: β -actina			Gen de referencia: GAPDH		
# de copias	LOG*	Ct**	# de copias	LOG	Ct
100,000	5	22.89	100,000	5	26.77
100,000	5	22.98	100,000	5	28.1
100,000	5	22.97	100,000	5	27.12
10,000	4	29.04	10,000	4	31.4
10,000	4	28.98	10,000	4	31.76
10,000	4	28.99	10,000	4	31.23
1,000	3	34.04	1,000	3	35.87
1,000	3	33.68	1,000	3	36.08
1,000	3	34.28	1,000	3	36.3
100	2	36.13	100	2	39.89
100	2	37.2	100	2	40.5
100	2	38.93	100	2	40.73
10	1	41.12	10	1	43.95
10	1	41.96	10	1	43.03
10	1	42.13	10	1	44.65

LOG*= logaritmo del número de copias

Ct**= primer ciclo en el cual se detecta fluorescencia debido a la amplificación del producto)

Una vez que se obtuvieron estos datos se graficaron (figura 11) para obtener la ecuación de la recta y calcular la correlación de los datos (r^2) (la cual ofrece una medida de cuán adecuada es la relación lineal entre los valores de x y y). Un valor de R cercano a 1 indica que la relación entre los valores de x y y es directamente proporcional. Si el coeficiente de correlación se aleja de 1, las predicciones basadas en la relación lineal $y = mx + b$, no serán confiables.

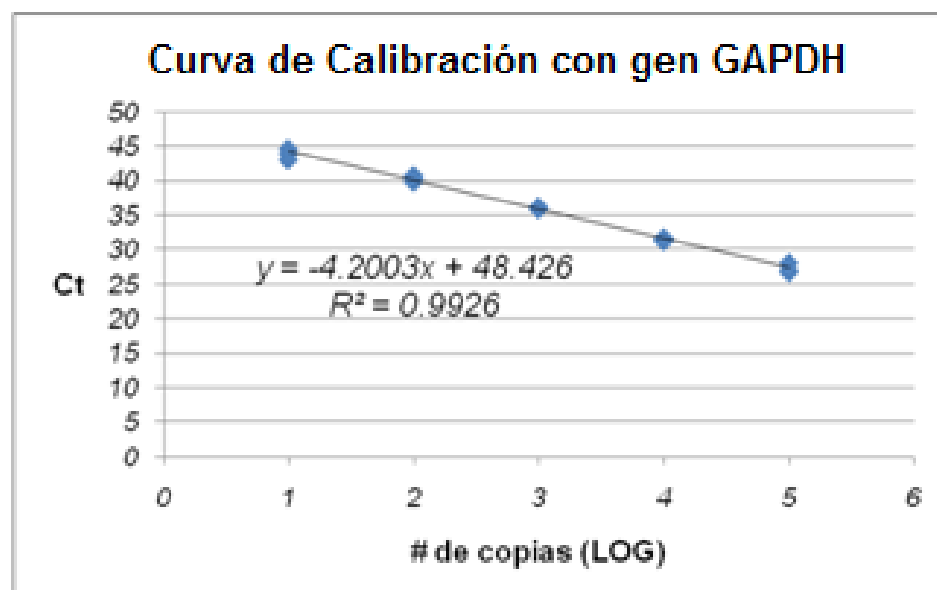
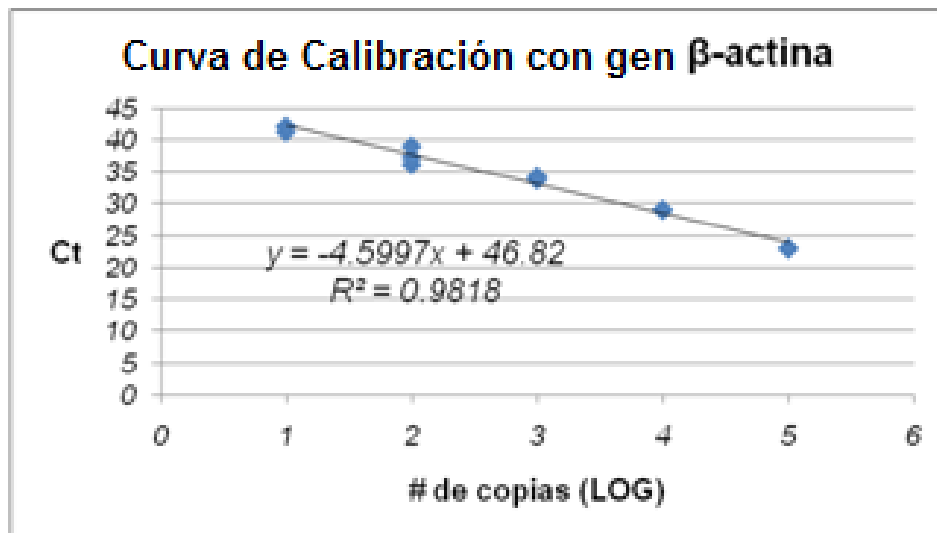


Figura 11. Curva de calibración para los datos de amplificación de los genes de referencia. En la parte superior se observa la gráfica para los datos obtenidos de la amplificación del plásmido con el gen de β -actina, con una ecuación de la recta de $y=4.5997x + 46.82$ y una R^2 de 0.9818. De igual manera se muestra en la parte inferior la gráfica para los datos obtenidos con el gen GAPDH, con una ecuación de la recta de $y=4.2003x + 48.426$ y una R^2 de 0.9926.

6.4 Lectura de los genes de referencia en las muestras positivas para VPH.

Se amplificó la región de interés de los genes de referencia en las 20 muestras elegidas para el estudio (positivas para el VPH de tipo 16). Esto se hizo para poder

obtener posteriormente el número de copias del genoma viral presentes en cada una de ellas. Estos datos se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Lecturas de amplificación y número de copias para las muestras de estudio para los genes de referencia.

Muestra	Diagnóstico	Gen B-actina		Gen GAPDH	
		Ct	# de copias	Ct	# de copias
L15	CaCU	34.04/32.49	884.98	36.4/37.12	598.99
L16	CaCU	27.98/28.32	11434.08	39.67/38.9	150.06
L18	Adenocarcinoma	32.28/30.67	2168.14	41.36/40.58	59.58
L22	CaCU	29.65/28.49	7226.82	41.72/39.82	66.49
L23	LIEAG	33.15/31.65	1364.54	36.43/36.12	781.43
L85	LIEAG	31.28/30.16	3163.94	38.21/39.75	177.37
L88	LIEAG	27.93/28.29	11685.75	40.51/41.22	63.11
L94	LIEAG	29.46/27.61	9446.25	40.71/39.11	106.53
MT27	CaCU	32.56/33.14	1089.32	40.05/37.82	181.80
G129	VPH+ asintomáticas	29.21/29.23	6704.04	40.98/40.6	65.76
G140	VPH+ asintomáticas	32.47/29.22	1801.55	39.64/38.26	180.31
G141	VPH+ asintomáticas	27.82/28.29	12011.96	40.12/35.83	307.72
G146	VPH+ asintomáticas	28.68/29.08	7947.94	41.29/39.63	78.80
G148	VPH+ asintomáticas	31.03/30.39	3179.82	40.79/39.71	88.42
G150	VPH+ asintomáticas	31.06/31.26	2538.46	41.71/41.52	41.84
G151	VPH+ asintomáticas	31.09/30.97	2709.15	37.8/40.15	177.86
G153	VPH+ asintomáticas	32.48/32.48	1310.98	36.94/44.92	60.90
S1	LIEBG	30.65/30.94	3047.35	41.86/41.34	42.18
S209	LIEAG	31.31/32.03	1966.50	39.75/43.54	41.15
S342	LIEAG	29.34/29.36	6281.65	38.41/39.86	162.92

* Los datos de Ct para cada gen se muestran por duplicado

6.5 Re-caracterización enzimática de clonas positivas para el genoma del VPH 16.

La caracterización fue realizada mediante cortes con las enzimas de restricción *DraIII*, *PstI* y *EcoRI*, para comprobar que el plásmido portaba la región subgenómica de 3Kb (figura 10) del genoma del VPH tipo 16, el cual se utilizó para llevar a cabo la curva

de calibración del gen viral E7. Los patrones de cortes esperados se muestran en el cuadro 12.

Cuadro 12. Cortes enzimáticos esperados para el vector que contiene la región subgenómica de 3Kb del genoma del VPH 16.

Enzimas	<i>DraIII</i>	<i>PstI</i>	<i>EcoRI</i>
Fragmentos esperados	3068 pb	3713 pb	3501 pb
	2303 pb	1776 pb	2420 pb
	1434 pb	1100 pb	636 pb
		216 pb	248 pb

Las clonas que resultaron positivas en este análisis (figura 12) fueron crecidas en medio líquido LB y se les extrajo posteriormente el ADN plasmídico por la técnica de lisis alcalina. Se hicieron cálculos y diluciones seriadas a partir de una muestra concentrada del plásmido para obtener desde 10 hasta 10, 000, 000 copias del plásmido en cuestión.

De la misma manera se llevó a cabo la re-caracterización del plásmido, portador de la región subgenómica de 5Kb (figura 12) del genoma del VPH tipo 16. Para esto se utilizaron las enzimas *BamHI*, *AclI* y *EcoRI*, mostrando los patrones de cortes esperados en el cuadro 13.

Cuadro 13. Cortes enzimáticos esperados para el vector que contiene la región subgenómica de 5Kb del genoma del VPH 16.

Enzimas	<i>BamHI</i>	<i>AclI</i>	<i>EcoRI</i>
Fragmentos esperados		5925 pb	5047 pb
	4410 pb	1368 pb	3501 pb
	4360 pb	1263 pb	222 pb
		214 pb	

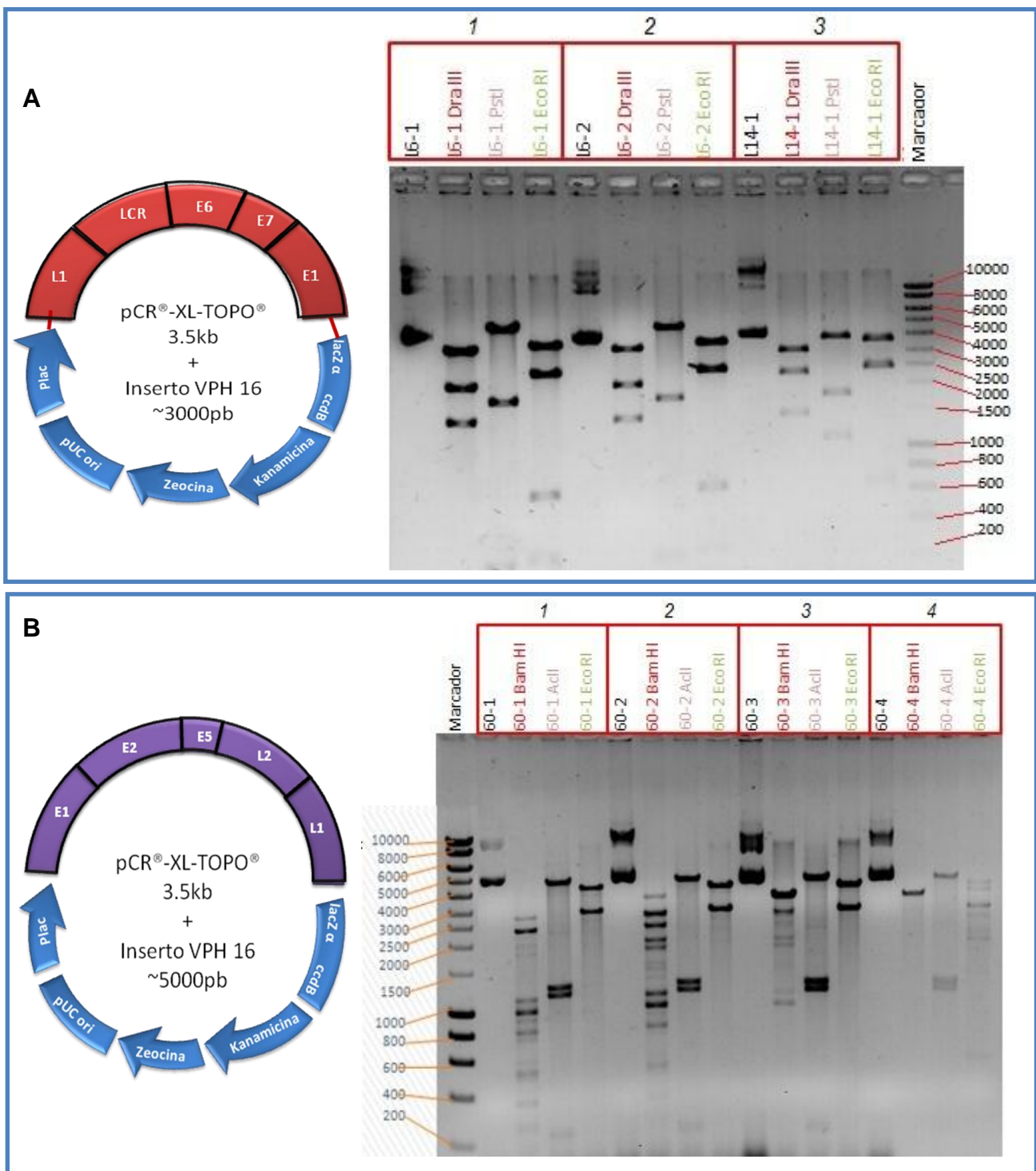


Figura 12. Digestiones enzimáticas de los vectores portadores del genoma de VPH. A la izquierda de A y B se muestran diagramas de los vectores de clonación Topo XL, a los que se les insertaron los fragmento de 3Kb y 5kb respectivamente, del genoma del VPH tipo 16. Se caracterizó por cortes con enzimas de restricción. Se mostrándose los resultados de las electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las enzimas utilizadas se indican en el recuadro superior de cada gel. Así mismo se señala el tamaño de cada banda del marcador en el costado del gel.

6.6 Curva de calibración para el gen viral E7

Una vez corroborados los patrones de digestión se prosiguió a realizar preparaciones del plásmido a diferentes números de copias, desde 10 hasta 10, 000, 000, para que por medio de los datos obtenidos por PCR en tiempo real (cuadro 14) se pudiera cuantificar este gen viral presente en las muestras de estudio y calcular la carga viral.

Cuadro 14. Datos de amplificación para las preparaciones con diferentes copias del gen viral E7.

# de copias	LOG	Ct	# de copias	LOG	Ct	# de copias	LOG	Ct
10,000,000	7	16.9	100,000	5	24.29	1,000	3	31.1
10,000,000	7	16.69	100,000	5	24.22	100	2	34.79
10,000,000	7	16.69	10,000	4	27.47	100	2	34.3
1,000,000	6	20.25	10,000	4	27.2	100	2	34.24
1,000,000	6	21.15	10,000	4	27.35	10	1	38.44
1,000,000	6	22.88	1,000	3	30.4	10	1	38.59
100,000	5	24.36	1,000	3	27.8	10	1	38.35

Con los datos generados que se describen en el cuadro 14 se procedió a realizar la curva de calibración (figura 13).

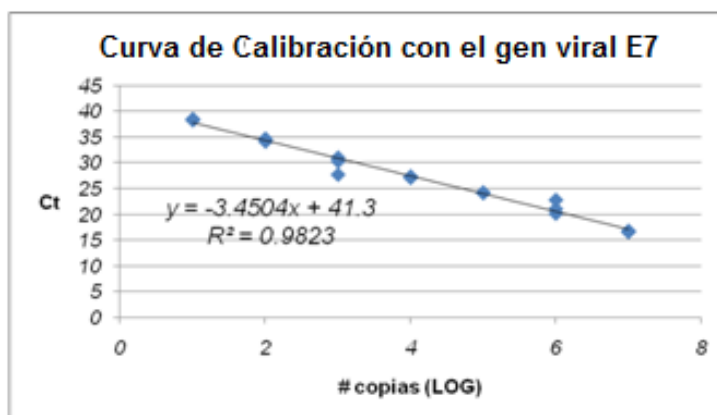


Figura 13. Curva de calibración usando los datos de amplificación del gen E7 del VPH tipo 16. Se observa la gráfica de los datos obtenidos en la amplificación del plásmido con el gen E7, con una ecuación de la recta de $y = -3.4504x + 41.3$ y una R^2 de 0.9823.

6.7 Cuantificación de la carga viral.

Una vez obtenida la curva de calibración, se prosiguió a amplificar la región del gen E7 en las muestras infectadas por el VPH 16 y con los datos obtenidos se llevó a cabo su normalización usando como normalizadores los valores obtenidos con el gen de referencia (GAPDH), para así determinar el número de copias del genoma viral existentes por célula. Los datos obtenidos por PCR en tiempo real se muestran en el cuadro 15, así como los de la carga viral obtenida para cada una de las muestras analizadas al ser normalizadas con el gen de referencia.

Cuadro 15. Datos de la amplificación del gen viral E7 en las muestras estudiadas.

Muestra	Diagnóstico	Ct E7*	Carga Viral
L15	CaCU	17.21/17.02	34114.70
L16	CaCU	24.62/24.41	975.91
L18	Adenocarcinoma	24.17/24.29	2972.84
L22	CaCU	23.14/23.14	5513.93
L23	LIEAG	17.47/21.86	4769.02
L85	LIEAG	30.73/30.55	13.86
L88	LIEAG	30.5/30.5	42.76
L94	LIEAG	26.62/26.62	337.39
MT27	CaCU	20.28/26.2	1886.28
G129	VPH+	24.22/24.38	2570.57
G140	VPH+	31.48/31.25	8.40
G141	VPH+	37.31/37.04	1.13
G146	VPH+	36.83/36.62	1.54
G148	VPH+	35.58/36.48	1.86
G150	VPH+	36.14/37.54	2.32
G151	VPH+	22.42/24.54	8.9
G153	VPH+	39.92/38.06	1.45
S1	LIEBG	32.5/31.7	21.99
S209	LIEAG	20.64/27.12	5436.40
S342	LIEAG	24.9/25.07	656.87

* Los datos de Ct para E7 se muestran por duplicado

Una vez que se determinó la carga viral, se llevó a cabo una prueba de Spearman, la cual permite medir la correlación o asociación de dos variables (figura 14), siendo en este caso la carga viral y el estadio de la lesión [lesión intraepitelial de bajo grado (LIEBG), lesión intraepitelial de alto grado (LIEAG) o CaCU]. En estos experimentos se obtuvo un valor de $R_s = 0.776$ y un $V_p = 5.74 \times 10^{-5}$. Además para esta asociación se encontró una diferencia estadísticamente significativa con las LIEBG y LIEAG con un V_p de 0.014 y entre LIEBG y CaCU con un V_p de 0.006 (en donde se rechazaría la hipótesis en el caso que el valor de P asociado al resultado observado es mayor que el nivel de significación establecido, siendo en este caso 0.05).

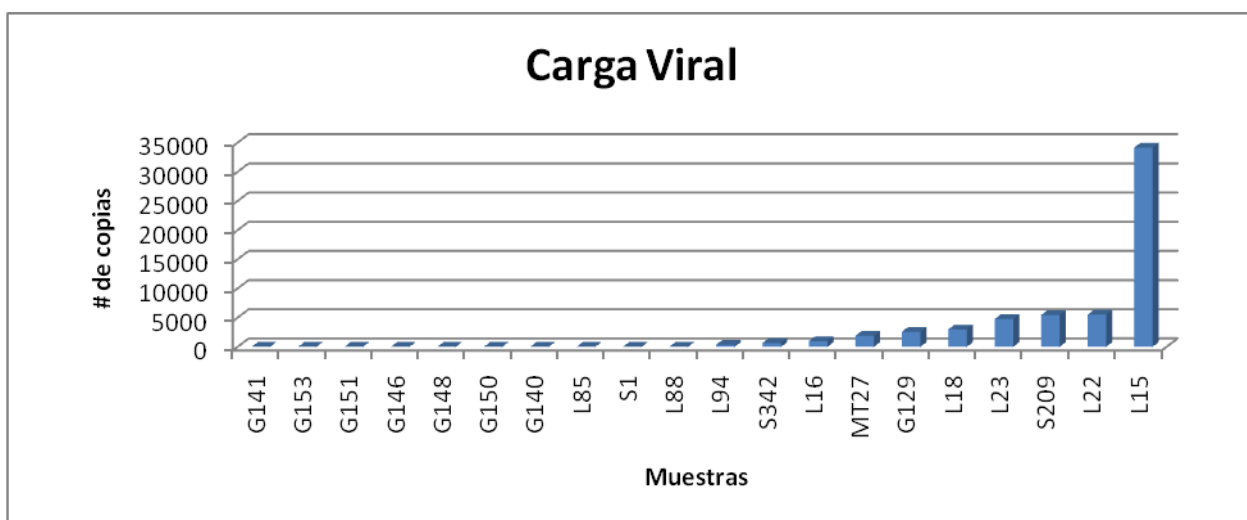


Figura 14. Representación gráfica de la relación del grado de lesión con la carga viral. La gráfica despliega en el eje de las abscisas las muestras en estudio ordenadas en base al grado de lesión y en el de las ordenadas el número de copias del genoma viral presente es las muestras.

6.8 Curva de calibración para los genes E2 y L1 del VPH 16.

A partir del plásmido que contiene el fragmento de 5Kb del genoma del VPH se le hizo PCR en tiempo real para cuantificar tres diferentes regiones del gen viral E2 (figura 6): el dominio amino (N1) terminal, la bisagra y el dominio carboxi terminal (C). Al igual que en el caso anterior, se realizaron preparaciones con diferentes números de copias del plásmido en un rango de 10 hasta 10, 000, 000.

Los datos obtenidos en las amplificaciones de las diferentes regiones del gen E2 del VPH tipo 16 se muestran en el cuadro 16.

Cuadro 16. Amplificación de las diferentes regiones de E2 y L1 del plásmido conteniendo 5kb del genoma del VPH.

# de copias	LOG	Ct E2N1	Ct E2H	Ct E2C	Ct L1
10000000	7	17.33	15.39	15.01	12.78
10000000	7	17.45	15.55	14.69	12.7
10000000	7	17.4	15.41	14.89	12.64
1000000	6	20.76	18.69	18.85	16.51
1000000	6	20.66	18.58	18.65	16.43
1000000	6	20.77	18.63	18.7	16.54
100000	5	24.3	22.24	22.79	20.28
100000	5	24.33	22.21	22.83	20.35
100000	5	24.36	22.2	22.7	20.36
10000	4	28.01	25.97	26.59	23.56
10000	4	28	25.91	26.57	23.97
10000	4	28.04	25.9	27.45	23.73
1000	3	31.2	29	30.6	27.2
1000	3	31.17	29.08	30.43	27.02
1000	3	31.13	28.97	30.54	26.99
100	2	35.11	32.98	36.11	30.78
100	2	34.78	32.75	34.25	30.91
100	2	35.17	32.96	34.2	30.75
10	1	39.62	36.94	37.59	35.85
10	1	38.69	35.25	40.46	34.8
10	1	39.11	36.15	41.23	35.27

Con los datos del cuadro 16 se llevó a cabo la curva de calibración (figura 15) para cuantificar las muestras por medio de la ecuación de la recta.

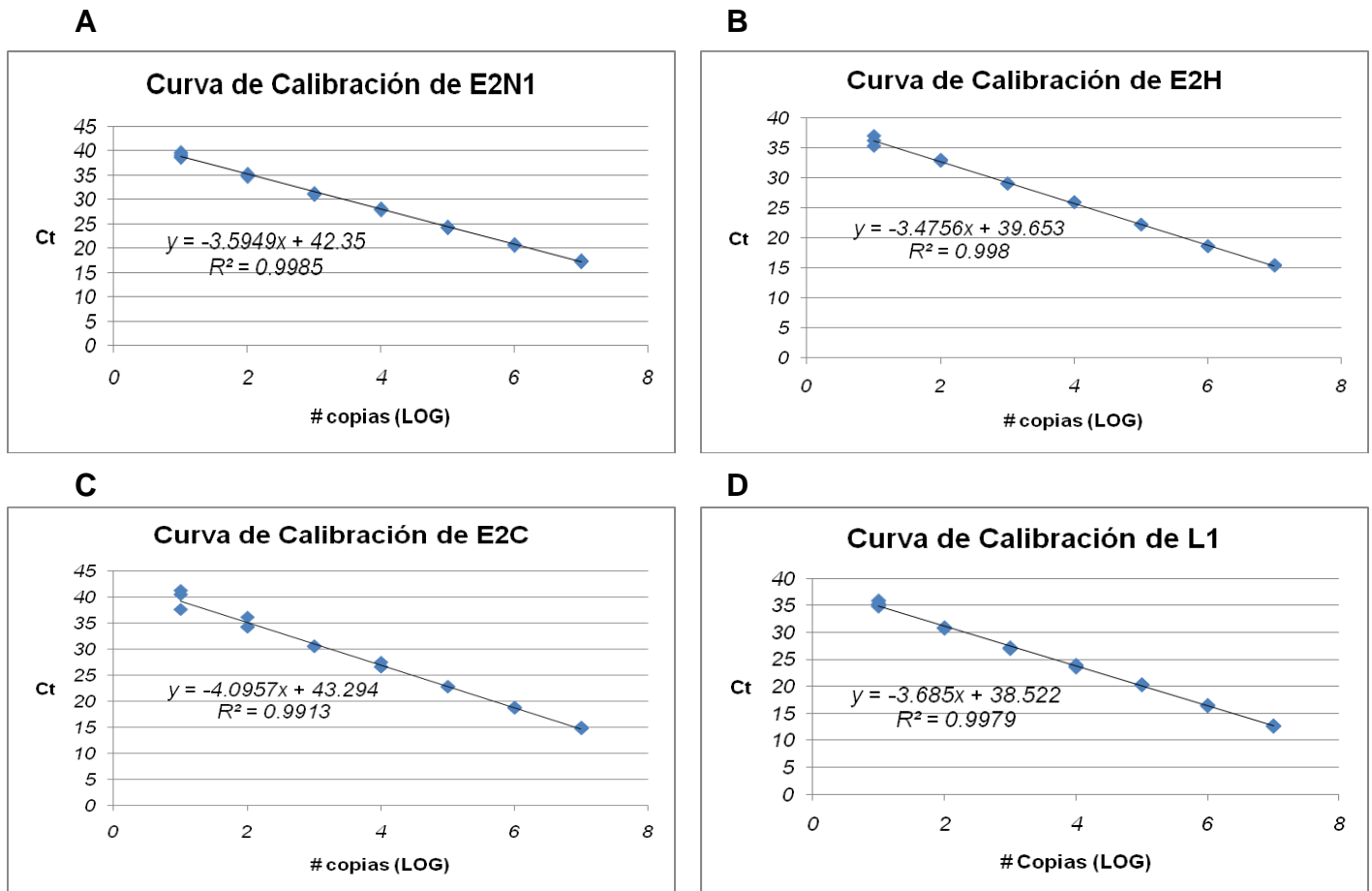


Figura 15. Curvas de calibración para los datos de amplificación de diferentes regiones del gen viral de E2 y L1. A. Se muestra la curva de calibración para E2N1, obteniendo una ecuación de la recta $y = -3.5949x + 42.35$ y una R^2 de 0.9985; **B.** Se muestra la curva de calibración para E2H, obteniendo una ecuación de la recta $y = -3.4756x + 39.623$ y una R^2 de 0.998; **C.** Se muestra la curva de calibración para E2C, obteniendo una ecuación de la recta $y = -4.0957x + 43.294$ y una R^2 de 0.9913; **D.** se muestra la curva de calibración para L1, obteniendo una ecuación de la recta $y = -3.685x + 38.522$ y una R^2 de 0.9979.

6.9 Determinación del Coeficiente de Integración.

Para obtener la relación del genoma de VPH 16 que se encuentra integrado vs el episomal presente en las muestras analizadas, se comparó el número de copias del gen E7 (siendo que este gen no se rompe y tiende a estar integro) contra el número de copias de los genes en cuestión (cuadro 17). Los valores de Ct para cada región cuyo número de copias se determinó a partir de las amplificaciones practicadas a las muestras para PCR de tiempo real que se muestran en la figura 16.

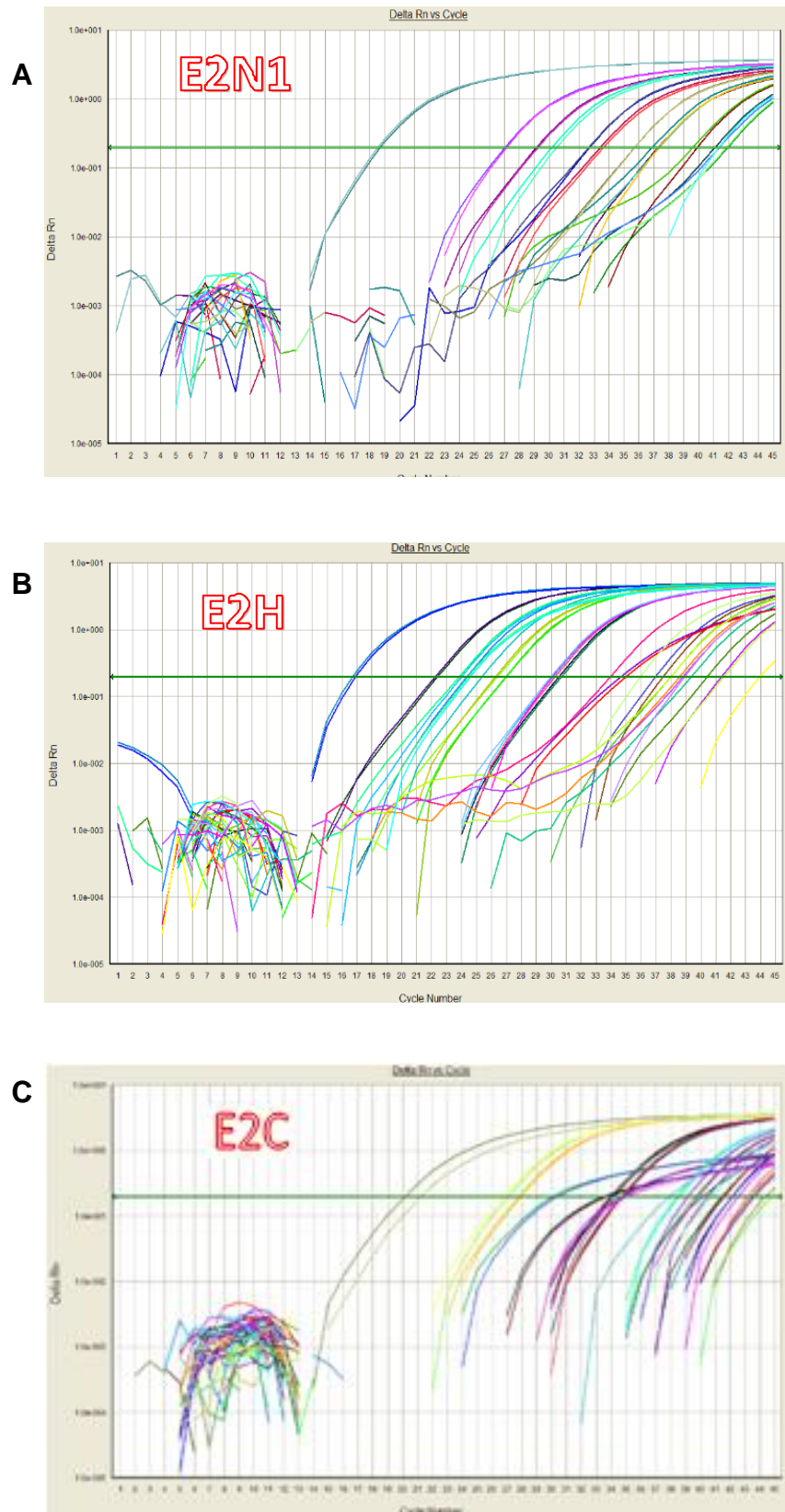


Figura 16. Representaciones gráficas de las amplificaciones de las muestras. Gráficas arrojadas por el software StepOne para las amplificaciones de las regiones de E2N1 (A), E2H (B) y E2C (C) de los genomas virales presentes en las muestras.

Cuadro 17. Amplificaciones de regiones del genoma del VPH en las muestras de estudio.

Muestra	Ct N1	Ct H	Ct C	Ct L1
L15	18.69/18.51	16.68/16.91	20.15/21.20	15.49/15.59
L16	26.33/27.65	24.31/25.33	27.8/27.95	23.96/25.48
L18	0/0	24.4/24.55	33.85/33.62	26.65/27.2
L22	24.12/24.09	22.36/22.21	30.12/30.41	23.04/22.41
L23	24.94/28.16	34.65/35.02	40.17/37.95	28.77/27.23
L85	31.49/31.31	30.23/30.08	34.23/34.06	32.16/32.07
L88	35.72/32.89	30.48/30.66	34.77/34.62	29.74/30.21
L94	28.17/28.91	26.98/27.02	34.76/34.7	28.54/28.08
MT27	30.18/30.46	26.34/26.24	34.84/35.18	27.3/30.06
G129	0/0	23.83/24.03	27.1/26.79	23.34/25.48
G140	32.69/32.64	30.11/30.01	34.02/34.77	37.99/36.28
G141	39.6/41.87	0/0	41.51/42.22	35.65/343.62
G146	0/0	34.01/41.34	38.53/38.38	32.89/36.32
G148	39.95/41.10	38.8/38.95	41.43/43.58	36.62/37.9
G150	0/0	37.01/37.44	40.44/41.55	35.88/34.95
G151	36.91/37-34	0/0	39.15/39.85	34.1/34.03
G153	41.98/37.28	37.51/35.99	0/0	38.06/35.11
S1	33.4/33.62	30.95/30.99	34.95/34.52	30.16/30.21
S209	29.16/29.24	26.57/27.23	29.74/30.06	26/30.31
S342	27.06/27.13	23.44/23.56	31.71/31.31	24.76/24.32

Una vez obtenidos los datos anteriores, se calcularon los números de copias para cada una de las muestras analizadas, tal y como se muestra en el cuadro 18, para corroborar si existe diferencia de ruptura dentro del gen E2.

Cuadro 18. Número de copias por célula del genoma viral en cada una de las muestras, en función de los genes en estudio.

Código	# copias E7	# copias L1	# copias E2N1	# copias E2H	# copias E2C
L15	10217208.39	1957942.46	4041862.60	3773168.33	333135.78
L16	73223.99	4434.93	18765.47	18524.75	5816.75
L18	88563.04	1027.64	0	23281.76	215.73
L22	183298.07	16686.36	119111.81	99339.69	1517.54
L23	1863320.25	504.86	134.57	24.34	10.81
L85	1228.84	32.82	1114.32	540.46	171.32
L88	1349.19	135.92	8.90	410.55	125.75
L94	17971.29	407.71	5033.97	4370.41	123.30
MT27	171465.10	320.89	2220.28	6995.26	105.34
G129	84521.07	5449.42	0	33405.90	9811.77
G140	757.49	1.18	494.42	575.57	148.86
G141	15.69	4.43	2.81	0	2.30
G146	21.18	6.29	0	3.71	15.19
G148	33.68	1.08	3.22	1.67	1.56
G150	19.62	3.67	0	5	3.64
G151	791.07	9.03	28.41	0	8.44
G153	4.67	1.69	4.54	4.13	0
S1	463.83	118.09	287.77	314.97	121.92
S209	111863.91	453.96	4549.46	4669.76	1863.20
S342	53510.29	5010.91	17519.09	44416.35	753.64

Los valores de número de copias fueron graficados para comprobar que el gen E7 siempre estuviese íntegro y el número de copias de éste fuese mayor (figura 17).

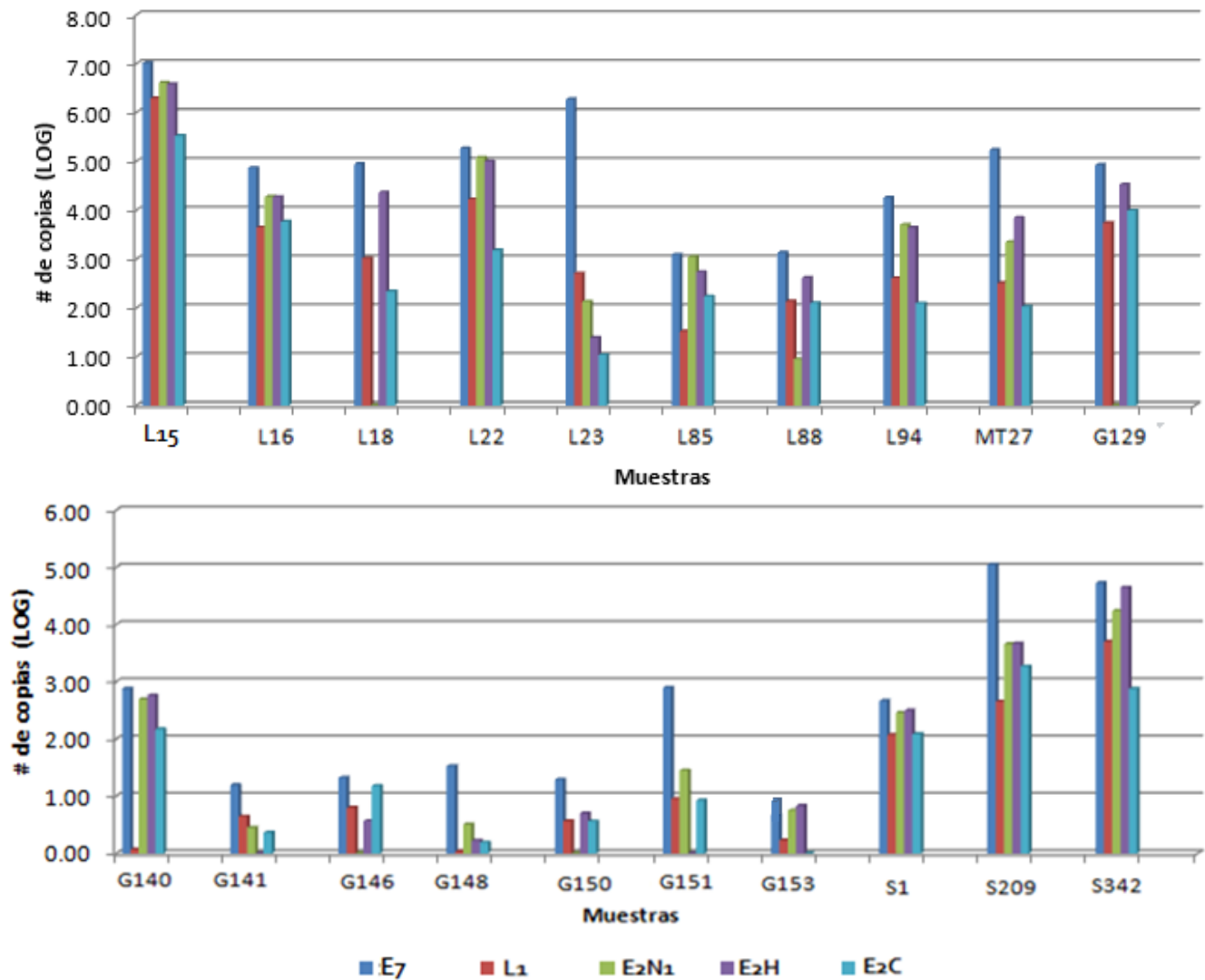


Figura 17. Comparación del número de copias de los genes del VPH en cada una de las muestras estudiadas. Se observa que el gen viral E7 se encontró íntegro reflejado en un mayor número de copias en todas las muestras, además de existir una variabilidad de ruptura en las regiones del gen E2 estudiadas.

Así mismo se gráfico lo encontrado que el sitio de mayor frecuencia de ruptura es la región E2C, seguido por L1 en segundo lugar, E2N1 en tercer lugar y por último la región E2H del gen viral E2 (figura 18).

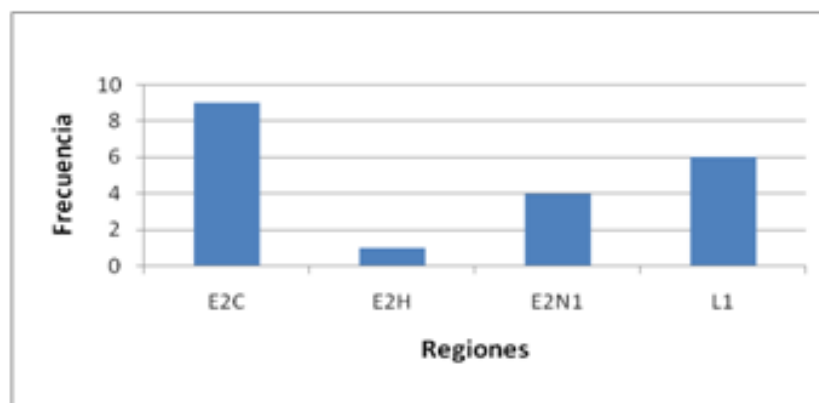


Figura 18. Sitios de ruptura comunes encontradas para las muestras en estudio. Se muestra que la región correspondiente al carboxilo terminal es el sitio más común para la ruptura o desaparición del gen E2.

Una vez corroborada la integridad del gen viral E7, se obtuvo la relación del número de copias de L1, E2N1, E2H y E2C de forma logarítmica en base diez entre el número de copias del gen E7 de forma logarítmica en base diez, para así determinar el coeficiente de integración (cuadro 19).

Cuadro 19. Determinación del coeficiente de integración del genoma viral.

Muestra	L1/E7*	E2N1/E7	E2H/E7	E2C/E7
L15	0.90	0.94	0.94	0.79
L16	0.75	0.88	0.88	0.77
L18	0.61	0.00	0.88	0.47
L22	0.80	0.96	0.95	0.60
L23	0.43	0.34	0.22	0.16
L85	0.49	0.99	0.88	0.72
L88	0.68	0.30	0.83	0.67
L94	0.61	0.87	0.86	0.49
MT27	0.48	0.64	0.73	0.39
G129	0.76	0.00	0.92	0.81
G140	0.02	0.94	0.96	0.75
G141	0.54	0.38	0.00	0.30
G146	0.60	0.00	0.43	0.89

G148	0.02	0.33	0.15	0.13
G150	0.44	0.00	0.54	0.43
G151	0.33	0.50	0.00	0.32
G153	0.34	1.00	1.00	0.00
S1	0.78	0.92	0.94	0.78
S209	0.53	0.72	0.73	0.65
S342	0.78	0.90	0.98	0.61

* Coeficiente entre el número de copias por cada gen.

6.10 Diseño de iniciadores

Teniendo en cuenta la estructura del virus al momento de romperse en E2 (figura 19) e insertarse al genoma humano, se diseñaron oligos en una zona adyacente a la ruptura, como es en el gen L2.

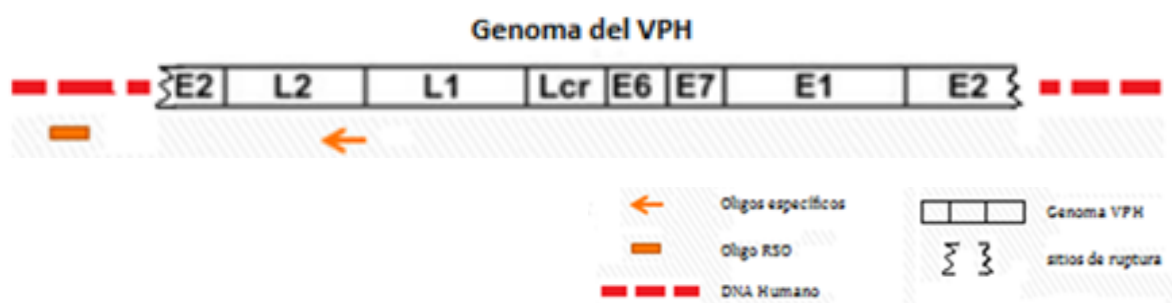


Figura 19. Representación de la ruptura viral. Se muestra el sitio elegido para el diseño de oligonucleótidos para encontrar el sitio en el genoma donde el virus se integra.

6.11 Estandarización de la PCR de integración

La estandarización de la PCR para identificar el sitio de se llevó a cabo haciendo un gradiente de temperaturas (figura 20), se siguieron las condiciones obtenidas del artículo de Thornland y cols.⁴⁸ y algunos parámetros se modificaron (cuadro 20).

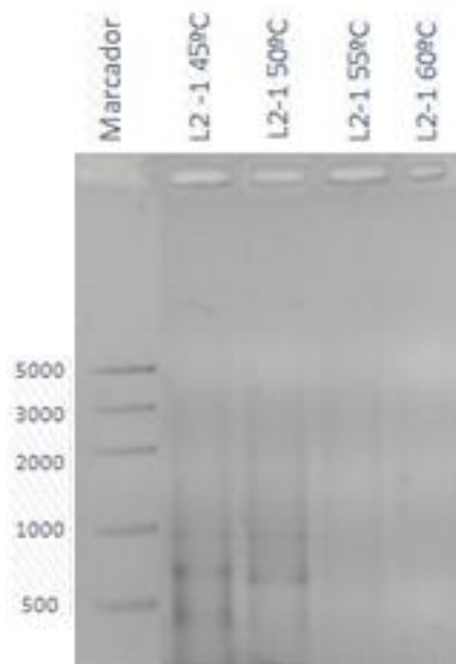


Figura 20. Gradiente de temperatura para la estandarización de la PCR de integración. Se muestra la electroforesis de los amplicones del probable sitio de integración en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio, generados a diferentes temperaturas de alineamiento. En el primer carril se encuentra el marcador HyperLadder de peso molecular de un rango de 100 a 5000pb; en el segundo carril utilizando 45°C; en el tercer carril a 50°C, en el cuarto carril 55°C y en el último carril 60°C, pudiéndose observar una mejor amplificación en el carril de 45°C.

Cuadro 20. Condiciones modificadas para llevar a cabo la PCR de integración.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	3min	1
94	30s	10
45	30s	
68	3min	
94	30s	25
45	30s+ 10s/ciclo	
68	3min	
72	10min	1
4	∞	

Una vez elegida la temperatura de alineamiento idónea se prosiguió a hacer una prueba con los oligos RSO, para comprobar si era igual de eficiente si se empleaban los cuatro oligos juntos o si alguno tendría un desempeño disímil (figura 21),

observándose un mejor desempeño al usar solamente RSO-Eco o RSO-Taq junto con L2-1.

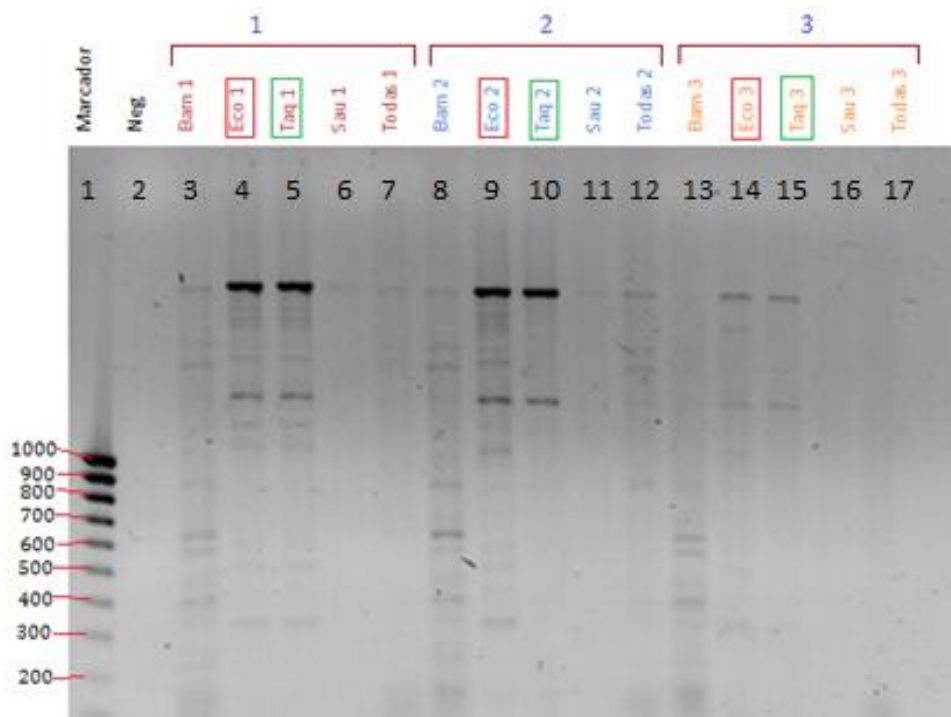


Figura 21. Prueba de eficiencia con los oligos RSO. Se muestra la electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio de los amplicones de los probables sitios de integración. En el primer carril se encuentra un marcador HyperLadder de peso molecular de un rango de 100 a 1000pb; en el segundo carril el control negativo; del carril 3 al 7, del 8 al 12 y del 13 al 17 se encuentran 3 series de PCR en donde se coloca en el primer carril el oligo Bam, en el segundo Eco, en el tercero Taq, en el cuarto Sau y en el quinto se colocan todos los oligos, en donde lo que se cambia es la muestra de ADN y se utilizaba como primer “forward” L2-1.

Una vez optimizada la PCR de eficiencia con los oligos RSO, se hizo para todas las muestras y se cortaron las bandas más visibles y separadas de las demás. En este caso resultaron evidentes y abundantes bandas de aproximadamente 5000pb y otras de alrededor de 1500pb, las cuales se purificaron para llevar a cabo una PCR utilizando el oligo anidado al primero (L2-2) y las condiciones especificadas en el cuadro 21, ajustándose según los requerimientos del oligo en cuestión. A los productos ya purificados se les practicaron dos tipos de PCR: en una, únicamente se utilizó el oligo Eco-RSO y en otra sólo se usó el oligo L2-2; esto para discriminar que las bandas que estaban siendo obtenidas fuesen amplificaciones virales y no del genoma humano. Con esto se comprobó que las bandas de 5000 en efecto se amplificaban a partir del oligo

RSO, por lo que se decidió trabajar con las bandas de 1500, ya que estas sí amplificaban con ambos oligos (figura 22).

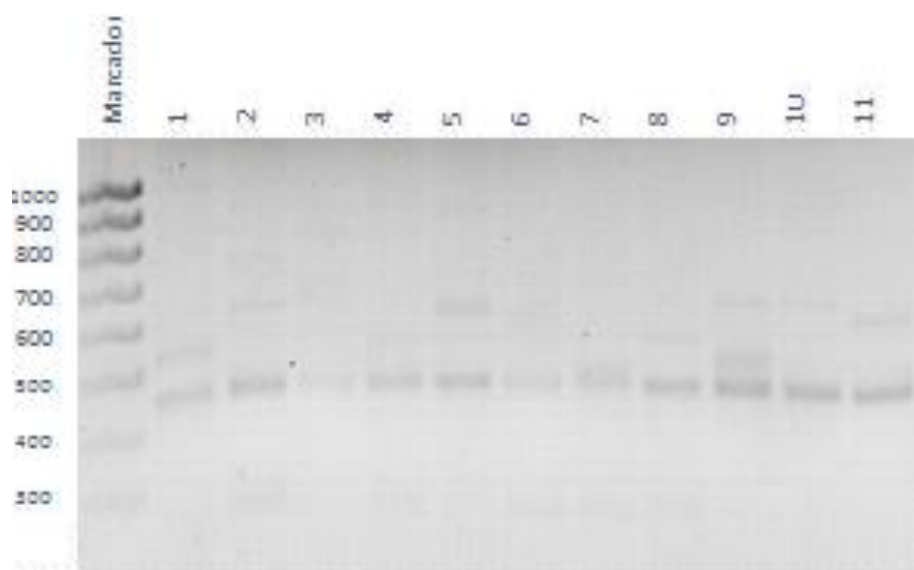


Figura 22. PCR del producto purificado, utilizando el oligo anidado L2-2 y el Eco-RSO. Se muestra la electroforesis de los amplicones de ~450pb, obtenidos de la PCR anidada de los probables sitios de integración. El gel es de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se encuentra un marcador HyperLadder de peso molecular de un rango de 100 a 1000pb; en los siguientes carriles se observan ampliaciones donde se tomó como templado el ADN purificado de las bandas de las diferentes muestras estudiadas utilizando el primer anidado “forward” L2-2 y el primer “reverse” Eco-RSO.

Cuadro 21. Condiciones de PCR utilizando el oligonucleótido anidado L2-2.

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	3min	1
94	30s	35
62	60s	
68	60s	
72	5min	
4	∞	

Se decidió hacer una prueba haciendo una PCR en donde únicamente se colocó el oligo específico para VPH (L2-2), probando las mismas condiciones de termociclado arriba mencionadas y con las cuales se pudo obtener una banda específica más abundante (figura 23), con lo que se pudo proceder a su secuenciación.

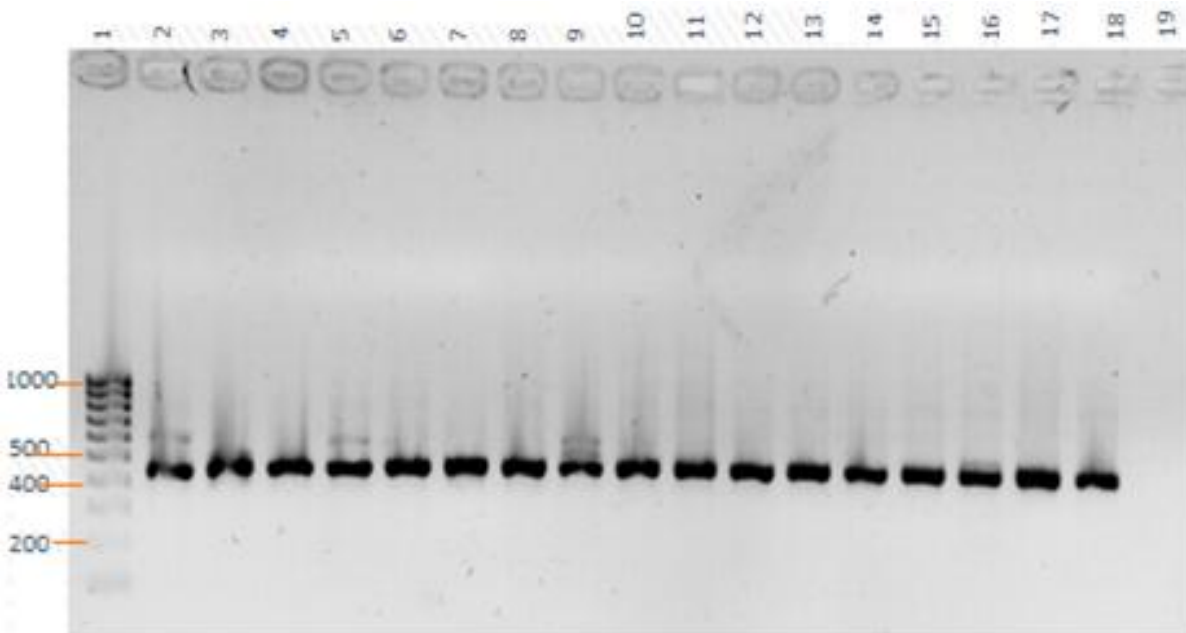


Figura 23. Amplificación del producto purificado utilizando sólo el oligo L2-2. Se muestran los amplicones resueltos por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio. En el primer carril se encuentra un marcador HyperLadder de peso molecular de un rango de 100 a 1000pb; del carril 2 al 18 amplificaciones de 450pb de muestras positivas para VPH; en el carril 19 el control negativo.

6.12 Secuenciación del producto de PCR

Al producto de amplificación de 450pb se le hizo la limpieza con EXO/SAP para eliminar los residuos de oligonucleótidos para su posterior procesamiento para secuenciación.

6.13 Análisis de los productos de secuenciación

Una vez que se obtuvieron las secuencias nucleotídicas de los productos de PCR, se hizo una búsqueda en la base de datos del NCBI, para encontrar el sitio en el genoma humano donde se integra el virus. Además se compararon las secuencias en búsqueda de similitudes utilizando el programa computacional Clustal W (figura 24).

Al rastrearse las secuencias obtenidas en la base de datos de NCBI no se arrojaban ninguna secuencia de referencia. Debido a esto se decidió comparar las secuencias entre sí en busca de diferencias o similitudes, esto para corroborar si existía relación entre las secuencias de las distintas muestras, esperando encontrar algún patrón de repetición que nos permitiera dilucidar el comportamiento de inserción

viral, en donde sólo se encontraron algunos cambios parecidos entre una y otra secuencia, pero en su mayoría diferencias nucleotídicas.

```

2   TATAGCCTGTGCGTCCCGCAGAGTGTGCATAT-CCAGGCCGAGGAAGGCCGGGA-CCCCAGCCTACGCCTG
3   TATAGCCTGTGCGTCCAGCAGAGTGTGCATAT-CCATGCCGAGGAAGGCCGGGA-CCCCAGCCTAGGCCGG
4   AATAGCCTGTGCGTCCAGCAGAATTGGGCTTAACCAGACCCAGGTGAGCGTGA-CCTTCGCCCTCCGCCGG
16  TATAGCCTGTGCGTCCCGCAGAATTGA--CACACCCGGCCAGATGAGCGTGA-CCCC-CCTCCGCCGA
6   TATTGCCTGTGCGTCCAGCAGAGTGTGCACAT-CTCGGCCGAGGTGGGCTGGA-CCTTTGCCCGGCCGG
9   TATAGCCTGTGCGTCCAGCAGAGTGTGCATAT-CCCGGCCGAGGTGGGCCGGGA-CCTTCGCCCTACGCCGG
14  TATAGCCTGTGCGTCCAGCAGAGTTTGCATAT-CCCGGCCGAGGTGGGCCGGGA-CCCCTGCCCTACGCCGG
10  TATAGCCTGTGCGTCCCGCAGCGTGTGCATCT-CCAGGCCGAGGTGGGCCGGGA-CCCCTGCCCTCCGCCGG
13  TATAGCCTGTGCGTCCAGCGGCGTGTGCATAA-CCCGGCCGAGGTAGGCCGGGA-CCTTTGCCCTACGCCGG
15  TATAGCCTGTGCGTCCAGCAGAATGTGCACAT-CCAGGCCGAGGAAGGCCGGGA-CCCCTGCCCTCCGCCCTG
7   TATAGCCTGTGCGTCCAGCAGAATGTGCATAT-CCAGGCCGAGGTGGGCCGGGA-CCCATGCATACGCCGG
5   TATAGCCTGTGCGTCCAGCAGAATGTGCATAT-CCAGGCCGAGGTAGGCCGGGA-CCTTCGCCCTACGCCGG
1   TATAGCCTGTGCGTCCCGCAGCGTGTGCATAT-CCAGGCCGAGGAGGCCGGGA-CCCCTGCCCTACGCCGG
11  TATAGCCTGTGCGTCCCACAGCGTTTGCATAT-CCATGCCGAGGAAGGCCGGGA-GATAAGCCTAGGCCCTG
12  TATAGCCTGTGCGTCCCACAG-GCCTGTTT-T-CCA-ACCGATGGAAGCGGGACGATCAGCCGACGCCGG
8   TATAGCCTGTGCGTCCCACAGAGTAGGCATCT-CCATGCCGAGGAAGGCCGGGA-GATCAGCCTAGGCCCTG
17  TATAGCCTGTGCGTCCCGCAGAGTTTGCATCT-CCAGGCCGAGGAGGCCGGGA-CCCCAGCCTACGCCTG
    ** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

2   CATGCAGGTGGGGTGTCCCTAGAAAAGAAGCATGCAGTAGGAGGG---TGGGAATAACACGGTGATAGACT
3   CATGCAGGTGGGGTGTCCCTAGAAAAAAGCATGCGGGAGGAGGG---TGGGAAGAACACGGTGATAGACT
4   CATGCAGGTGGGGTGTCCCTGGTAAAAAACCATTCGGTAGGTGGGGGTGGGGGAAAAAAGGGGGTTAATA
16  CATGCATGTGGGGGTCTCCTTTAAAATGC-CTCTGTATGTTGG---GGGAAGAATACGGTGATTAAC-
6   CAAGCATGTGGGGTCTCCCTAGTAAAGAAACCATTTCAGTAAAGTGGG---TGGGAAGAATAGGGTAATAGACA
9   CATGCATGTGGGGTGTCCCTAGAAAAGAAGCATGCGGTAGGTGGG---TGGGAAGAATACGGTGATAGACT
14  CATGCATGTGGGGTGTCCCTAGAAAAGAAGCATGCGGTAGGTGGG---TGGGAAGAATACGGTGATAGACT
10  CATGCATGTGGGGTGTCCCTGGTAAAGAAGCATGCAGGAGGAGGG---TGGGAAGAATACGGTGATAGACT
13  CATGCATGTGGGGTGTCCCTGTAAAAAACCATGCAGGAGGAGGG---TGGGAAGAATACGGTGATAGACT
15  CCTGCATGTGGGGTCTCCCTAGAAAAGAAGCCTTTGGGAGGTGGG---TGGGAAGAATACGGTGATAGACT
7   CATGCATGTGGGGTGTCCCTAGAAAAGAAGCATGCAGTAGGTGGG---TGGGAAGAATACGGTGATAGACT
5   CATGCATGTGGGGTGTCCCTAGAAAAGAAGCATGCGGTAGGTGGG---TGGGAAGAATACGGTGATAGACT
1   CATGCAGGTGGGGTGTCCCTAGAAAAGAAGCATGCAGGAGGAGGG---TGGGAAGAATACGGTGATAGACT
11  CATGCAGGTGGGGTGTCCCTAGAAAAGAAGCAGC-AGGAAGAGGG---TGGGAAGAACACGGTGATAGACT
12  CCTGCAGGTGGGGTGTCCCTAGAAAATGCATTTAGTAGGTGGG---TGGGACGATCAGGTTACTAGACT
8   CCTGCAGGTGGGGTCTCCCTAGTAAATTCGCTTCAGGAGGTGGG---TGGGACTAACACGGTAATAGACA
17  CATGCAGGTGGGGTGTCCCTAGAAAATCCATGCAGGAGGAGGG---TGGGAAGAACACGGTGATAGACT
    * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

Figura 22. Comparación de las secuencias de los amplicones de los sitios de integración de las muestras en estudio. Se empleó el programa ClustalW, indicando con un asterisco la similitud de las secuencias obtenidas y en subrayado el oligonucleótido utilizado.

CAPITULO VII

DISCUSIÓN

Como parte de la lucha contra el CaCU, se han realizado esfuerzos por lograr identificar a aquellas mujeres asintomáticas recién infectadas y aun sin alteraciones por el VPH, para poder prevenir que puedan llegar a desarrollar lesiones malignas. Esto con el propósito de advertir en qué estadio se encuentra la enfermedad. Al sumar a estos esfuerzos la determinación del estatus del genoma viral para cada uno de los tipos virales de alto riesgo, permitiría aunar estos datos con los epidemiológicos y clínicos para intentar hacer asociaciones que permitan predecir mejor el curso de la enfermedad.

De particular valor sería la información relativa a la carga viral, así como el grado y sitio de integración del virus al genoma celular.

7.1 Determinación de la Carga Viral.

En cuanto a la carga viral, se encontró una posible asociación entre el grado de lesión (LIEBG, LIEAG y CaCU) y el número de copias del virus, similar a lo referido en los trabajos de J. L. K. Cheung y colaboradores⁵⁶. Estos autores publicaron que a medida que el grado de lesión es más avanzada, mayor es el número de copias virales.

7.2 Determinación del cociente de integración

Se encontró que a diferencia de el trabajo arriba referido de J. L. K. Cheung y colaboradores, así como el de Paul K. S. Chan, quienes observaron que los sitios preferenciales de ruptura eran para el VPH 18 el E2N1 y para el VPH 58 el E2H, en este trabajo se encontró que el sitio de mayor frecuencia de ruptura es la región E2C del VPH 16, viéndose ésta en 45% de las ocasiones (9/20). Todos estos datos en conjunto sugieren que el virus al momento de integrarse al genoma celular, puede tener diferentes rearrreglos de inserción en donde en ciertas ocasiones desaparezca alguna zona del gen E2 o éste desaparezca totalmente. Esto se logra ver en las pacientes VPH positivas asintomáticas, las cuales tienen un diagnóstico de alteraciones inflamatorias inespecíficas, pudiéndose deber a una carga viral baja pero donde ya

existe integraciones completas. En cambio, en las pacientes con CaCU tienen una elevada carga viral y una alta tasa de integración. Por tanto, se esperaría que de persistir la infección en las mujeres VPH positivas asintomáticas, éstas podrían llegar a desarrollar cáncer debido a la inserción temprana y aguda.

7.3 Identificación del sitio de integración.

Para revelar las regiones en donde se inserta el genoma viral, se tomó en cuenta la conformación de la ruptura de E2 y se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitirían amplificar más allá de los bordes de inserción del virus en el genoma humano. Debido a lo reportado por los autores arriba mencionados, en cuyas publicaciones se describió que además del producto deseado se obtenían bandas inespecíficas utilizando los oligos RSO, se optó por llevar a cabo una PCR previa a la secuenciación utilizando un oligo específico de VPH, lo que permitiría concretar que la banda de amplificación, la cual se recortaba y purificaba, se originara a partir del virus. Al obtener las secuencias las cuales se ingresaron a la base de datos de "BLAST" del NCBI, estas no arrojaron resultados de similitudes a secuencias de genes ya antes reportadas, pudiéndose deber a que en el momento de integrarse el virus al genoma celular este puede causar rearrreglos en el sitio de integración generando nuevas secuencias como en el caso de VIH, mecanismo que no ha sido descrito para el VPH. Para confirmar esta hipótesis es necesario realizar más estudios en nuevas muestras VPH 16 positivas.

CAPITULO VIII

CONCLUSIÓN

Con los hallazgos e interpretaciones de las investigaciones que conforman el presente estudio se puede concluir que se alcanzó el objetivo de analizar el estado del genoma viral en muestras de mujeres infectadas con y sin lesiones y/o tumores, por lo que ahora se cuenta con una pieza más de información que aunada a los datos epidemiológicos y clínicos, se podrá contribuir a un mejor entendimiento del origen y evolución de este grave problema de salud pública.

Las conclusiones particulares referidas a los objetivos planteados, son:

8.1 Determinación de la Carga Viral.

Se logró comprobar que en las muestras que se utilizaron para el estudio, las cuales están infectadas por el VPH de tipo 16, el grado de lesión depende de la carga viral, en donde a medida que aumenta ésta, la lesión empeora. Esta determinación podrá servir para definir un mejor pronóstico a la paciente y advertirle de las posibles consecuencias que esto le pueda traer.

8.2 Determinación del cociente de integración.

Además del aporte de la carga viral, el discernimiento del grado de integración del genoma viral en el de la paciente puede ayudar a precisar el diagnóstico y pronóstico. En este trabajo se encontraron integraciones totales en un 35% (presentándose en las pacientes asintomáticas) y parciales en un 65% (presentándose integrado y episomal en las pacientes con LIEAG y CaCU).

8.3 Identificación del Sitio de Integración.

Se encontraron secuencias referidas a los sitios de integración, las cuales podrían dar un indicio del mecanismo de integración del VPH, en donde al integrarse cambie totalmente la secuencia de los sitios adyacentes a la integración.

CAPITULO IX

BIBLIOGRAFÍA

1. <http://journalmex.wordpress.com> "LA INCIDENCIA DE CÁNCER CÉRVICO UTERINO CRECERÁ EN AMÉRICA LATINA". (abril 2010)
2. Dilliner J, Trends over time in the incidence of cervical neoplasia in comparison to trends over time in human papillomavirus infections. *J Clin Virol*, 2000. 19 (1-2): p. 7-23
3. Agency for Health Care Policy and Research Evaluation of cervical cytology. Technology Assessment Report No.5 1999 (cited available from: <http://www.ahcpr.gov/clinic/tp/cervtp.htm>).
4. Kumar, MBBS, MD, FRCPath, V.; Abul K. Abbas, MBBS, Nelson Fausto, MD y Jon Aster, MD (2009). «Cérvix: premalignant and malignant neoplasias», Saunders (Elsevier) (ed.). *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, 8th edición.
5. Herrera Homez A, Granados Garcia M y Gonzalez Barón M. "Manual de Oncología" *Procedimientos médicos quirúrgicos*. McGraw Hill. 3º ed. México 2006.
6. Hausen H zur. Papillomaviruses in the causation of human cancers- a brief historical account. *Virology* 2009; 384:260-265
7. Chen Y, Hunter DJ. Molecular epidemiology of cancer. *CA Cancer J Clin*. 2005;55:45-54
8. Instituto Nacional del Cáncer. Los virus del papiloma humano y el cáncer. www.cancer.gov/espanol/cancer/hojas-informativas.
9. Doorbar J, Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clinical Science* (2006) 110, 525-541
10. Burk RD et al, Sexual behavior and partner characteristics are the predominant risk factors for genital human papillomavirus infection in young women. *J Infect Dis*, 1996. 174(4): p. 679-689
11. Burk RD et al. Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis*, 1996. 23(4): p.333-341
12. Brinton LA, Reeves WC, Brenes MM, Parity as a risk factor for cervical cancer. *American Journal of Epidemiology*, 2001. 153: p 732-739

13. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002; 359(9312):1085-92
14. Coker AL, et al., Active and passive smoking, high-risk human papillomaviruses and cervical neoplasia. *Cancer Detect Prev*. 2002; 26(2):121-8.
15. Piyathilake CJ, et al. Methylenetetrahydrofolatereductase (MTHFR) polymorphism increases the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Anticancer Res*, 2000; 20(3A):1751-7.
16. dos Santos SI, et al., Socioeconomic differences in reproductive behaviour. *IARC Sci Publ*. 1997; (138):285-308.
17. Buitrago-Perez A, et al. Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling. *Current Genomics*, 2009; 10(1):26-34.
18. Cann A. *Virology: Papillomaviruses*. *Microbiology@Leicester*. Encontrado en: <http://www-micro.msb.le.ac.uk/3035/Papillomaviruses.html>
19. Zur Hausen H. Papillomavirus infection: a major cause of human cancers. *BiochemBiophysActa*. 1996: 1288: F55-78
20. Arriagada R, "Oncogénesis Viral: VPH y Cáncer Cervicouterino", *Medwave* (junio 2006)
21. Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol*. 2002; 40(3):886-891
22. Muñoz N, et al., Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.
23. Lillo F, Uberti-Foppa C. Human Papillomavirus viral load: a possible marker for cervical disease in HIV-infected woman. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (2006) 57, 810-814
24. Sun CA, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY. Viral load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynaecol Obstet* 2002; 76: 41-7

25. Lorincz AT, Castle PE, Sherman ME, Scott DR, Glass AG, Wacholder S, et al. *Viral load of human papillomavirus and risk of CIN3 or cervical cancer. Lancet 2002; 360: 228-229*
26. Van Duin M, Snijders PJ, Schrijnemakers HF, Voorhorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuis MA, et al. *Human papillomavirus 16 load in normal and abnormal cervical scrapes: an indicator of CIN II/III and viral clearance. Int J Cancer 2002; 98: 590-595.*
27. Flores R, Papenfuss M, Klimecki WT et a. *Cross-stional analysis of oncogenic VPH viral load and cervical intraepithelial neoplasia. Int J Cancer 2006; 118:1187–93.*
28. Moberg M, Gustavsson I, Gyllensten U. *Type-specific associations of human papillomavirus load with risk of developing cervical carcinoma in situ. Int J Cancer 2004; 112:854–9*
29. Chen QY, Bian ML, Chen ZH. *Detection of integration status of human papillomavirus 16 in cervical precancerous lesions, Zhonghua Yi XueZaZhi 2005: 85(6): 400-4.*
30. Hopman AH, SmedtsF, et al. *Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of VPH 16/18 and numerical chromosome abnormalities. J. Pathol 2004: 202(1): 23-33*
31. Daniel B, Mukherjee G, Seshadri L. *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 (Pt10): 2589-93*
32. Pirami L, Giache V, Becciolini A. *Analysis of VPH16, 18, 31, and 35 ADN in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. J ClinPathol 1997: 50(7);600-604*
33. G. Hudelist, M. Manavi y K.I. Pischinger, *Physical state and expression of VPH ADN in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade, Gynecol Oncol 2004; 92(3): 873-80*
34. Chen CM, Shyu MP, Au LC. *Analysis of deletion of the integrated human papillomavirus 16 sequence in cervical cancer: a rapid multiplex polymerase chain reaction approach. J Med Virol 1994; 44(2): 206-11*
35. Luft F, Klaes R, Nees M. *Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. Int JCancer 2001; 92(1): 9-7*

36. Vernon SD, Unger ER, Miller DL. Association of human papilloma virus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *Int J Cancer* 1997; 74(1): 50-6.
37. Kalantari M, Blennow E, Hagmar B. Physical state of VPH16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas, *Diagn Mol Pathol* 2001; 10(1): 46-54.
38. Hegde RS. The papillomavirus E2 proteins: Structure, function, and biology. *Annu Rev Biomol Struct* 2002; 31: 343-60
39. Massimi P, Pim D, et al. Interaction between the VPH-16 E2 transcriptional activator and p53. *Oncogene* 1999; 18: 7748-7754
40. Yee C, Krishnan-Hewlett I, et al. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *Am J Pathol* 1985; 119: 361-366
41. Baker CC, Phelps WC, et al. Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol* 1987; 61(4): 962-971
42. Peter M, Rosty C, et al. MYC activation associated with the integration of VPH ADN at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 2006; 25: 5985-5993
43. Romanczuk H, Howley PM. Disruption of either the E1 or E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad USA* 1992; 89(7):3159 .
44. Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 ADN into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92(5): 1654-8
45. Alazawi W, Pett M, Arch B. Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. *Cancer Res* 2002; 62: 6959-65
46. Jeon S, Allen-Hoffmann BL, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 into the human genome correlates with a selective growth advantage of cells, *J Virol* 1995; 69(5), 2989-2997.
47. Thorland EC, Myers SL, Persing DH. Human papillomavirus type 16 integrations in cervical tumors frequently occur in common fragile sites. *Cancer Res* 2000; 60: 5916-5921

48. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith D. Common fragile sites are preferential targets for VPH 16 integrations in cervical tumors. *Oncogene* 2003; 22: 1225-1237
49. Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S. Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 886-
50. Wagatsuma M, Hashimoto K, Matsukura T. Analysis of integrated human papillomavirus type 16 ADN in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences. *J Virol* 1990; 64: 813-
51. Cannizzaro LA, Durst M, Mendez MJ. Regional chromosome localization of human papillomavirus integration sites near fragile sites, oncogenes, and cancer chromosome breakpoints. *Cancer Genet Cytogenet* 1988; 33: 93-
52. Kalantari M, Blennow E, Hagmar B. Physical state of VPH16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 2001; 10, 46-
53. Mendoza Gutierrez R., Tesis de Maestria. "Estrategia para la clonación y caracterización del genoma viral a partir de bioespecímenes positivas para VPH".
54. Peter M, Rosty C, et al. MYC activation associated with the integration of VPH AND at the MYC locus in genital tumors. *Oncogene* 2006; 25; 5985-5993.
55. Applied Biosystems Protocols: TaqMan PCR Reagent Kit with Controls.
56. Cheung J L K, et al. Increase of integration events and infection loads of human papillomavirus type 52 with lesion severity from low-grade cervical lesion to invasive cancer. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46; 1356-1362.