



UNIVERSIDAD DEL VALLE DE MÉXICO  
CAMPUS CHAPULTEPEC

---

---

ESCUELA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
INCORPORADA A LA UNAM

“DETECCIÓN Y GENOTIPO DEL VPH EN MUESTRAS  
DE TEJIDO CERVICAL POR PCR”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

**JAZBET GALLEGOS BOLAÑOS**

DIR. DE TESIS: M. en C. EDUARDO DEL REY PINEDA.  
Dr. EDUARDO STALIN GARCÍA LÓPEZ.

MÉXICO, D.F.

2007.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE: M. en C. Eduardo del Rey Pineda.  
VOCAL: Q.F.B. Gerardo García Camacho.  
SECRETARIO: Q.F.B. Javier Araiza Santibañez  
1er. SUPLENTE: Dr. Juan Antonio Giménez Scherer.  
2º. SUPLENTE: Q.F.B. Martha Laura Luna Ontiveros.

Sitio donde se desarrolló la investigación:

Departamento de Biología Molecular, Lab. Referencia Internacional  
CARPERMOR.

---

M. en C. Eduardo del Rey Pineda.  
**Director de Tesis**

---

Jazbet Gallegos Bolaños.  
**Autoría del Trabajo**



## **DEDICATORIA**

### ***A Dios***

Por permitirme llegar a este momento tan especial en mi vida. Por los triunfos y los momentos difíciles que me han enseñado a valorarte cada día más.

### **A mi Padre**

Con mucho cariño a quien le debo la vida, y ha estado conmigo en todo momento le agradezco la comprensión, la paciencia y el apoyo que me brindó para culminar mi carrera profesional. Por inculcarme y cultivar el don de la responsabilidad. Gracias por darme una carrera para mi futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre has estado apoyándome y brindándome todo tu amor. Por todo esto te agradezco de todo corazón el que estés conmigo a mi lado.

### **A mi Abuelita**

Con mucho cariño, quien ha sido una madre para mí, Gracias por tus consejos, por el amor incondicional que siempre me has brindado, por escucharme y brindarme palabras de aliento e impulso para seguir adelante cuando lo he necesitado, darme su comprensión, tiempo y la motivación constante que me ha permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor.

### **A mi Madre**

Por darme la vida y ser una parte muy importante. Aunque no estas aquí se que estarás orgullosa de mí por la culminación de una parte importante en mi vida profesional. Se que siempre voy a tener un ángel que me cuida, protege y me guía para no perderme.

### **A mis Hermanos**

Jacob, Noemí, Horeb y Ruth. Por que se que siempre contare con ellos para todo, gracias por su confianza que siempre nos hemos tenido; por el apoyo y amistad. Los quiero mucho

### **A mi Patito Cua Cua**

Gracias por todo tu apoyo y por siempre impulsarme a seguir, a no dejarme caer en los momentos de flaqueza, por su apoyo incondicional, por ayudarme a concluir mi trabajo de tesis, por ser una parte importante en este, no solo por su enseñanza sino aún más por su cariño y comprensión. Gracias por estar conmigo y recuerda que eres muy importante para mí.

### **A mi Tía Bety**

Gracias, por ser mi confidente y brindarme tu apoyo en momentos difíciles. Siempre te lo agradeceré y sabes que cuentas conmigo.

A todos os quiero con todo mi corazón y este trabajo que me llevo dos años hacerlo es para ustedes.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Stalin García por su asesoría y dirección en el trabajo de investigación y acompañarme en este camino que hoy culmina en el presente proyecto.

A la Dra. Esther Herrera por permitir integrarme a Laboratorio de Referencia Internacional CARPERMOR.

Al Dr. Miguel Ángel Chávez por colaborar en la realización de este proyecto de investigación proporcionándonos parte del material de trabajo para dicha investigación

A Francisco Alvarado por su paciencia y dedicación al enseñarme lo relacionado con la histología, por el tiempo que me dedico, que fue importante para la conclusión de este trabajo.

A Mis Síndos: M. C. Eduardo del Rey Pineda, Q.F.B. Gerardo García Camacho, Q.F.B. Javier Araiza Sautibañez, Dr. Juan Antonio Giménez Scherer. Q.F.B. Martha Laura Luna Ontiveros. quienes revisaron con paciencia mi trabajo, por ayudarme a lo largo de la tesis desinteresadamente y brindarme su amistad. Le agradezco su confianza, el apoyo y aliento cuando lo necesite.

A la UVM por brindarme la educación y por permitirme ser parte de una generación de triunfadores y gente productiva para el país. Gracias a todos los profesores que contribuyeron realmente en mi formación, por todos sus consejos, sus clases, su paciencia y su amistad como persona.

Y a ti que estás leyendo este trabajo de tesis...



## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	ii
RESUMEN.....	vi
ABSTRACT.....	viii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. GENERALIDADES.....	1
2. CLASIFICACIÓN DEL VPH.....	3
3. EPIDEMIOLOGÍA.....	6
4. PATOLOGÍA.....	9
5. GENOMA VIRAL.....	15
6. CICLO CELULAR.....	19
7. CICLO DE REPLICACIÓN.....	24
8. CARCINOGENESIS .....	26
9. RESPUESTA INMUNE AL VPH .....	31
10. DIAGNOSTICO.....	33
11. TRATAMIENTO.....	49
II. JUSTIFICACIÓN.....	51
III. HIPÓTESIS.....	52
IV. OBJETIVOS.....	53
V. MATERIAL Y METODOS.....	54
5.1 DISEÑO ESPERIMENTAL.....	54
5.2 REACTIVOS .....	55
5.3 CONTROLES .....	56
5.4 MÉTODOS .....	66
5.5 DIAGRAMA DE FLUJO .....	84



<b>VI.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>85</b>
	6.1 Detección de VPH por PCR.....	85
	6.2 Genotipo de VPH por PCR.....	95
<b>VII.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>119</b>
<b>VIII.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>122</b>
<b>IX.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>123</b>
<b>X.</b>	<b>GLOSARIO-.....</b>	<b>127</b>
<b>XI.</b>	<b>ANEXOS..-.....</b>	<b>128</b>



## ABREVIATURAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
AP-1, NF-1/CTF, Octa-j, TEF o F,	Factores de transcripción de origen celular
ASCUS	Células escamosas atípicas de significado indeterminado
cDNA	DNA obtenido a partir de RNA
CE	<b>Celular enhancer</b> o potenciador de la transcripción
c-myc	Oncogen
d	Dalton (peso molecular de proteína)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DAP-12	Proteína adaptadora o activadora de 12 kD
dNTP	Desoxinucleotido trifosfato (bases nitrogenadas)
OD	Densidad óptica.
E	<b>Early</b> o región temprana del virus de Papiloma Humano
EGFr	Receptor de membrana para el factor de crecimiento epidérmico
E1-M	Modulador de la proteína E1 del virus de papiloma humano
E1-R	Factor de replicación la proteína E1 del virus de papiloma humano
E2-TR	Factor represor de transcripción
E6 y E7	Oncoproteínas del virus de papiloma humano
FDA	<b>Food and Drug Administration de los EE.UU.</b> o Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos



HLA	<b>Human leukocyte antigens</b> o Antígenos de histocompatibilidad humanos
hTERT	<b>Human Telomerase Reverse Transcriptase</b> o transcriptasa Reversa de la telomerasa humana
HSIL	Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Alto Grado.
HCS	Sistema de Captura Híbrida.
ICDK/C	Inhibidores de los complejos ciclina/quinasas dependientes de ciclina.
Ig	Inmunoglobulina.
IFN $\gamma$	Interferón gamma.
Kb	Kilobases.
kD	Kilodaltones
L	<b>Late</b> o región tardía del virus de papiloma humano.
LTC	Linfocito T citotóxico (CD8+)
LCR	<b>Leukocyte Receptor Complex</b> o Sistema receptor leucocitario.
LSIL	Lesiones Intraepiteliales Escamosas de Bajo Grado.
MHC	<b>Major histocompatibility complex</b> o Sistema mayor histocompatibilidad.
Mb	Megabase (un millón de pares de bases)
MgCl <sub>2</sub>	Cloruro de magnesio.
mRNA	Acido ribonucleico mensajero.
$\mu$ l	Microlitro.
NIC	Neoplasia Intraepitelial cervical.
NIP	Neoplasia intraepitelial del pene.



NIV	Neoplasia intraepitelial de la vulva.
nM	Nanomolar.
nm	Nanómetros.
ng	Nanogramos.
n	Tamaño de la muestra.
ORFs	<b>Open reading frames</b> o Marcos de lectura abierta.
PAP	Prueba de Papanicolaou.
PDGFr	Receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PCR-SSP	<b>PCR sequence-specific primer</b> o Reacción en Cadena de Polimerasa con iniciadores específicos.
pRb	Proteína del gen supresor de tumor retino blastoma.
pM	Picomolar.
pb	Pares de bases.
p53	Proteína celular implicada en mantener la integridad de replicación de la célula a lo largo del ciclo celular.
P97	Promotor de transcripción.
RLC	Región Larga de Control.
Rb	Gen supresor de tumor retino blastoma.
RNA	Ácido Ribonucléico.
Sp1	Proteína estimulante de la transcripción.
TCR	Receptor de células T.
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa.
Taq	Taq DNA polimerasa.



TBE	Amortiguador Tris, ácido bórico y EDTA.
VPH	Virus del Papiloma Humano.



## **RESUMEN**

El virus del papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico infeccioso asociado con la patogénesis del cáncer cervicouterino y se ha convertido en un gran problema de salud, considerado como la segunda enfermedad más común entre mujeres en todo el mundo. Es un virus silencioso que no presenta una sintomatología clara y evidente hasta un tiempo considerable después de la infección primaria; éste se encuentra fuertemente asociado con el desarrollo de lesiones benignas (condilomas o papilomas) fácilmente controlables; sin embargo los VPH de alto riesgo que infectan el tracto genital están asociados con la formación de lesiones malignas o precancerosas que llegan a desarrollar cáncer cervicouterino. El método de diagnóstico más común para detectar la presencia del VPH es el Papanicolaou, pero desgraciadamente se detecta cuando ya presenta alteraciones celulares que pueden degenerar en cáncer, además de tener una baja sensibilidad. El objetivo de este estudio fue utilizar una metodología más sensible, por biología molecular, para la detección y posterior genotipificación del VPH y así diferenciar entre los distintos tipos virales permitiendo elegir el tratamiento adecuado y oportuno. Un total de 143 muestras de tejido cervical parafinado con distintos niveles de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) fueron utilizadas para la detección del VPH por amplificación de la región L1, una región conservada en todos los tipos virales, mediante la técnica de PCR-SSP, utilizando como control interno el gen  $\beta$ -actina. Después se realizó el genotipo a las muestras detectadas utilizando las regiones E6 y E7 del VPH por PCR múltiplex y específica. El VPH fue detectado en 35.6% (51/ 143) de las muestras.



Con relación a el grado de neoplasia (NIC) se identifico el 28.6% en NIC I (18/63); 50% de NICII (20/40); y el 33.3% respecto al NIC III (13/ 40). Respecto a la frecuencia encontrada en el genotipo (11 tipos virales 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45,51 y 52) en las 51 muestras positivas a VPH fueron; VPH -16 (44%) seguido por VPH- 51 (16%); VPH- 6 (9%) VPH-11 (7%), VPH- 18 y 45 (5%), VPH- 30,31 y 35 (4%), VPH-52 (2%) y VPH- 33 (0%).

La frecuencia de genotipo de VPH en relación con el diagnostico histológico fue: NIC I VPH-16 (28%) , VPH 51 (24%), en NIC II VPH-16 (50%) , VPH- 51 (24%), respecto a NIC III solo predominan los tipos virales 16 y 18 siendo el VPH-16 por mucho el más frecuente con (85.7%) mientras que el 18 solo el (13.3%).

Se encontraron casos que incluyen más de un tipo viral presente en la muestra (Infecciones múltiples) 27.5 % (14/51), asociados a tipos virales de bajo riesgo con los de alto riesgo.



## **ABSTRACT**

The Human Papillomavirus (HPV) is the first etiology infection agent associated with the pathogenesis of cervicouterine cancer and it has turned to a great health problem, it is considered the second most common malignancy among the women worldwide. It is a quiet virus that does not display a clear and evident sintomatology after considerable time of the primary infection; it is strongly associated with the development of benign lesions (condylomas or papillomas) easily controllable. However, the HPV of high risk that infect the genital tract is associated with the formation of malignance or precancerous lesions that get to develop cervical cancer. The Papanicolaou is the method of diagnostic most common to detect the HPV. Unfortunately the Papanicolaou detects when it presents cellular alterations that can degenerate in cancer, also it has a low sensitivity. Therefore the objective of this study was to use a molecular methodology, more sensitive, for the detection and genotype the HPV, and thus to differentiate between the different viral types allowing to choose the suitable and oportune treatment. A total of 143 cervical fixed paraffin samples with different Cervical Intraepithelial Neoplasia (CIN) levels were used for the detection of the HPV by amplification of the L1 region, this region is conserved in all viral types, by the PCR-SSP technique, using as internal control de  $\beta$ -actine gen. After it was done the genotype being used the regions E6 and E7 of the HPV by multiplex and specific PCR. The HPV was detected in 35.6% (51/ 145) of the samples. In relation to the degree of neoplasia (CIN), it was identified the 28.6% in CIN I (18/63); 50% of CIN II (20/40); and the 33,3% with respect to CIN III (13/ 40).



With respect to the found frequency of genotypes (11 viral types 6, 11, 16, 18, 30, 31, 33, 35, 45, 51 and 52) in the 51 positive samples to HPV they were; HPV -16 (44%) followed by HPV- 51 (16%), HPV- 6 (9%) HPV-11 (7%), HPV- 18 and HPV-45 (5%), HPV- 30, 31 and 35 (4%), HPV-52 (2%) and HPV- 33 (0%).

The frequency of HPV genotype in relation to histologic diagnostic was: NIC I HPV-16 (28%), VPH 51 (24%), in NIC II HPV-16 (50%), HPV-51 (24%), with respect to single NIC III just predominates viral types 16 and 18, being the HPV-16 the most frequent with (85.7%) whereas the HPV-18 only (13.3%).

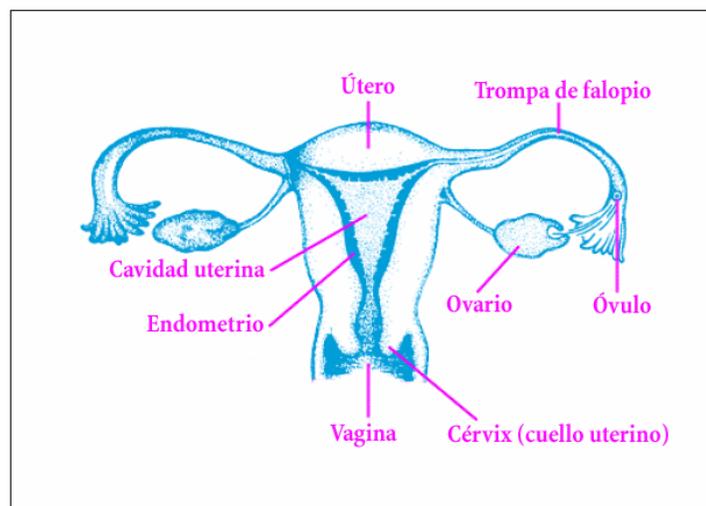
It were founded cases that including more than one viral type present in sample (multiple Infections) 27,5 % (14/51), associated low risk viral types with high risk viral types

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. GENERALIDADES.

El cáncer cervicouterino es una neoplasia en la cual se encuentran células cancerosas (malignas) en los tejidos del útero, el cuello uterino (cérvix), y el endometrio. (**Figura 1**)

El cáncer cervicouterino es la segunda enfermedad más común en mujeres precedido por el cáncer de mama, siendo una importante causa de muerte y aún más en países subdesarrollados. En México ocupa el primer lugar ya que cada 2 horas muere una mujer por esta causa <sup>(1, 2, 3, 4, 5)</sup>



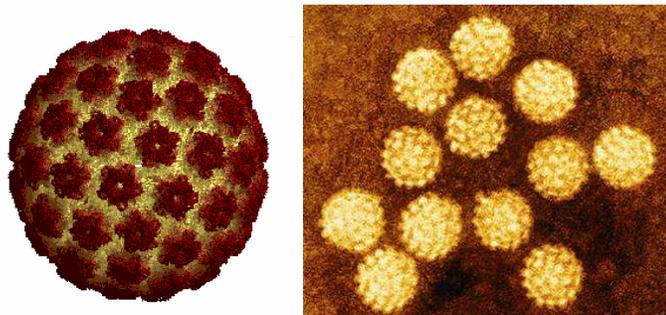
**Figura 1.** Donde se muestra el útero que es el órgano hueco en forma de pera donde se desarrolla el feto, y lo conecta con la vagina, el cuello uterino o cervix que es la abertura del útero, y el endometrio que es la pared interna que recubre al útero, en la que se forma cada mes la capa sanguínea que produce la menstruación Tomada de <http://www.4women.gov/espanol/preguntas/pap.htm>



El virus del papiloma humano (VPH) es el principal agente etiológico infeccioso asociado con la patogénesis del cáncer cervicouterino <sup>(1)</sup>. La infección por VPH es inicialmente asintomática y la transmisión puede ocurrir antes de que la expresión del virus se manifieste. Clínicamente el VPH infecta el epitelio de las células basales de la piel y de las membranas mucosas (orales y genitales), <sup>(3, 6, 7)</sup>. Muchas mujeres infectadas no desarrollan signos o síntomas clínicos pero son reservorios del virus por períodos variables de tiempo <sup>(8)</sup>.

Zur Hausen H. en 1976 <sup>(9)</sup> fue el primero en estudiar al VPH y relacionar su participación en carcinogénesis, posteriormente diversos estudios clínicos, epidemiológicos y moleculares lo establecen como el principal agente etiológico del cáncer cervicouterino <sup>(1,3,4)</sup>. Recientemente se ha demostrado que más del 95% de las mujeres con carcinoma cervical y el 50% con cáncer vulvar están infectadas con algún tipo de VPH <sup>(1, 2, 3, 10)</sup> Actualmente más de 100 tipos de VPH han sido identificados <sup>(3, 11, 12)</sup>

Los VPH son un grupo de virus de DNA que pertenece a la familia *Papovaviridae*, no poseen envoltura, y tienen un diámetro aproximado de 52-55 nm. Las partículas virales están compuestas por una cápside proteica, constituida por 72 capsómeros de estructura icosaédrica, que envuelven al genoma viral (**Figura 2**). El genoma esta organizado en 8 genes (E1, E2, E4, E5; E6, E7, L1 y L2) y una región larga de control <sup>(1,3, 5, 13, 14)</sup>



**Figura 2.** Microscopia electrónica del Papilomavirus Humano.Tomada de <http://webuct.za/depts/mmi/Standard/papillo.html>



La infección del VPH puede manifestarse de varias maneras:

**Latente**, que puede ser asintomático, evidencia del DNA viral en individuos con tejidos clínicamente e histológicamente normal identificado solamente por las técnicas de biología molecular.

**Subclínica**, alteraciones celulares y de la superficie del epitelio cervical, su expresión es mínima y son observadas por colposcopia y Papanicolaou.

**Clínica**, la expresión activa, que puede presentarse como lesiones benignas fácilmente controlables, denominadas condilomas o papilomas, éstos asociados a los VPH de bajo riesgo.

Sin embargo, los VPH de alto riesgo que infectan el tracto genital (cérvix, vulva, vagina, pene y ano) están asociados con la formación de lesiones malignas (displásicas) o precancerosas que pueden llevar a la transformación neoplásica <sup>(1,3)</sup>

Los VPH pueden ser detectados no sólo en los carcinomas de cuello uterino, sino también en sus lesiones precursoras (displasia / CIN / Lesiones intraepiteliales), lo cual estaría indicando que el virus sería el iniciador de la enfermedad mientras que otros factores genéticos celulares jugarían un rol crucial en la progresión de la enfermedad <sup>(13)</sup>

## 2. CLASIFICACIÓN DEL VPH

La clasificación de los papilomavirus se basa en la especie de origen y el grado de homología del DNA. Se han reportado en humanos más de 100 tipos, en bovinos 6, en perros 2, en conejos 2, en caballos, chimpancé y mono *rhesus* 1 tipo. Además se han identificado en aves y peces <sup>(2, 6)</sup>



A diferencia de lo que ocurre en otras familias virales, las proteínas de la cápside de los diversos tipos de VPH son antigénicamente similares, por lo tanto los VPH no pueden ser clasificados en serotipos, de tal forma su clasificación en genotipos y subtipos se basa en las diferencias a nivel de su secuencia de DNA. Se considera un nuevo tipo viral si tiene no más de un 90% de homología en la secuencia de nucleótidos en las regiones E6, E7 y L1, subtipos cuando tienen 90% al 98% y las variantes cuando comparten 98-99% de similitud <sup>(6,25, 41)</sup>. Hasta el momento más de 100 tipos diferentes de VPH han sido caracterizados, y aproximadamente 40 infectan el tracto genital; estos pueden clasificarse en dos grupos principales, de acuerdo con el sitio de infección: cutáneos y mucosos. (**Tabla 1-2**)

Los tipos de VPH mucosos asociados con lesiones benignas (tipos 6,11,43,44) son conocidos como tipos de "bajo riesgo", estos generalmente no se integran al genoma de las célula hospedera por la poca afinidad de las oncoproteínas virales E6 y E7 a P53 y Rb respectivamente <sup>(1, 3, 4, 6, 13, 14,)</sup> Aunque ocasionalmente se llegan a encontrar asociados a carcinomas. <sup>(14, 15)</sup>. Mientras que aquellos tipos asociados a lesiones malignas (tipos 16, 18, 26, 27, 30, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 50, 51 -59, 61, 62, 64, 66-69, 71-74) son conocidos como virus de "alto riesgo" debido a que se integran al genoma celular y a la afinidad de E6 y E7 a P53 y Rb. Dentro de esta clasificación los tipos virales 31,33, 35, 51, y 52 son conocidos como intermedio riesgo ya que es mas común encontrarlos en lesiones displásicas severas que en carcinomas. <sup>(1, 3, 4, 6, 14)</sup>. El VPH 16 se ha encontrado en más del 50% en carcinoma de células escamosas, mientras el VPH 18 se ha encontrado en más del 50% en adenocarcinomas <sup>(3, 16)</sup>



**Tabla 1.** Lesiones asociadas a diferentes tipos de Virus del Papiloma Humano (VPH).

TIPO DE VPH	LESIÓN ASOCIADA
<u>Cutáneos</u> 1,4 2,4 3,10 5,8,14,17,20 7 9,12,15,19,21-25,36,46,47 41	Verruga <i>plantaris</i> Verruca <i>vulgaris</i> Verruca plana Epidermodisplasia <i>verruciformis</i> Verrugas del carnicero Epidermodisplasia <i>verruciformis</i> Carcinoma de células escamosas cutáneas
<u>Mucosos</u> 6 11 13,32 16,18,31,33,35,45,51,52,56 30 39 34,58 40 42 43 44 54 55 57 59	Condiloma acuminado Papiloma laríngeo Hiperplasia epitelial focal NIC, Carcinoma de cérvix NIC, Carcinoma laríngeo NIC, Carcinoma de cérvix y pene NIC NIC, NIP NIC, papiloma vulvar NIC, hiperplasia vulvar NIC, condiloma vulvar Condiloma acuminado Papulosis Bowenoide NIC NIV

NIC = Neoplasia intraepitelial del cérvix  
 NIP = Neoplasia intraepitelial del pene  
 NIV = Neoplasia intraepitelial de la vulva

**Tabla 1** Tomada de [www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/librivir/papiloma.html](http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/librivir/papiloma.html)



**Tabla 2** Clasificación de acuerdo a la predilección por órganos

	<b>TIPO VPH</b>
Epitelio cutáneo	1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,14,15,17,19,20,21,22,23, 24,25,26,27,28,29,36,37,38,41,46,47,48,49,58.
Epitelio ano-genital	5,6,11,16,18,26,30,31,33,35,39,40,42,43,44,45,51, 52,53,54,55, 56, 57, 58, 59, 66, 68, 73, 82
Mucosa oral	1, 2, 6, 7, 11, 13, 16, 30, 32, 57

**Tabla 2.**Tomada de Consuegra Mayor C (2004)

### 3. EPIDEMIOLOGÍA

La transmisión del VPH ocurre primariamente de persona a persona por contacto directo con las áreas de la piel contaminadas. Los VPH genitales se transmiten por vía sexual, el VPH es muy resistente al calor y desecación y una transmisión vía fomites solo puede ocurrir como una exposición prolongada a la ropa contaminada compartida. <sup>(1)</sup>



La sola presencia del virus no es suficiente para el desarrollo de la neoplasia, aparentemente son necesarios otros factores para la progresión tumoral tales como factores genéticos, epigenéticos, hormonales, inmunológicos infecciones virales o bacterianas, etc. <sup>(13)</sup> (**Tabla 3**) También se ha demostrado en los estudios grandes que el riesgo de desarrollar el cáncer cervical está asociado fuertemente a la persistencia de los tipos de VPH de alto riesgo. <sup>(1, 3)</sup>

**Tabla 3** Algunos factores de riesgo propuestos que pueden incrementar el desarrollo del cáncer cervical.

<i>Factores de Riesgo</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Incremento del numero parejas sexuales</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Inicio de vida sexual a temprana edad</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Prostitución</li></ul>

<i>Asociación de factores de riesgo</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Uso de anticonceptivos orales</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Fumar (metabolitos de nicotina han sido identificados en la mucosa cervical de mujeres fumadoras) contribuye a la persistencia. (3)</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Infección con otras enfermedades de transmisión sexual como Herpes tipo II, <i>Chlamydia</i>, CMV</li></ul>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Multiparidad</li></ul>

**Tabla 3.** Tomada de Jastreboff AM (2002)



Un importante factor de emergencia en el desarrollo de neoplasias cervical es el papel de las variantes de VPH 16, ya que estas difieren en propiedades químicas biológicas y patogenicidad. Se han encontrado diferencias en las secuencias, en los sitios de unión a E2, sitios de unión de factores de transcripción o promotores, esto debido a mutaciones en algunas regiones del genoma viral. Lo que podría afectar directamente en un incremento de la actividad de los promotores de transcripción, promotores responsables de la expresión de las proteínas E6 y E7 o en la relación entre variantes de VPH y factores no virales como P53. Esto sugiere que hay variantes que pueden replicarse con mayor rapidez que otras y por lo tanto ser más oncogénicas <sup>(1, 11)</sup>. En un estudio realizado en México se encontró que las variantes más prevalentes son Asiático-Americano y Europeo, siendo los virus VPH16 Asiático-Americanos 9 veces más oncogénicos que los virus VPH16 Europeos. <sup>(11)</sup>

### **3.1 Incidencia y Mortalidad**

La incidencia de esta enfermedad varía cerca de 10 casos por 100,000 mujeres por año en países desarrollados, y más de 40 por 100,000 en países en vías de desarrollo. De medio millón de casos de cáncer cervical estimados anualmente en el mundo, casi el 80% ocurren en países en vías de desarrollo. México tiene uno de los índices más altos en la incidencia de cáncer cervical En 1995 (50 casos por 100,000 mujeres por año), y 16,000 casos nuevos se detectan cada año y se calcula que cada 2 horas muere una mujer por esta enfermedad en México <sup>(11)</sup>. En el 2002 con una tasa de incidencia de 29.5 por 100,000 habitantes y una tasa de mortalidad 8.6 por 100,000 mujeres, registrándose anualmente más de 4,000 muertes. <sup>(17, 18, 19)</sup> La alta incidencia de esta enfermedad puede reflejar un programa de cribado pobre y a las diferencias en el VPH que infecta a la población mexicana.

(11)



#### 4. PATOLOGÍA.

El cuello uterino está tapizado por dos tipos de epitelio, el exocervical, que es plano y pavimentoso y, el endocervical, que es cilíndrico mucosecretor. El sitio de unión de estos dos epitelios se denomina zona de unión escamo-columnar y es un área dinámica, sujeta a cambios constantes relacionados con la acción de las hormonas ováricas, como los estrógenos, que transforman el epitelio cilíndrico mucosecretor en epitelio pavimentoso. El cambio de epitelio cilíndrico en epitelio plano se denomina metaplasia y es normal. <sup>(20)</sup> El riesgo de infección del VPH coincide con la gran actividad metaplasica en este sitio. <sup>(1, 3)</sup>

La mayor actividad metaplasica ocurre en la pubertad y el primer embarazo y declina después de la menopausia. La infección es más común en mujeres jóvenes de 18 a 30 años con actividad sexual, sin embargo, el cáncer cervical es más común en mujeres mayores de 35 años, sugiriendo que la infección se adquirió en edad joven y la progresión a cáncer es lenta <sup>(2)</sup>. El VPH tiene un periodo de incubación de 3 a 4 meses. <sup>(1,3)</sup>

El VPH tiene un alto grado de tropismo por el epitelio escamoso en diferentes regiones corporales. Los tipos virales que inducen lesiones anogenitales se encuentran solamente en la región genital, mientras que los tipos asociados con verrugas cutáneas en manos y pies se encuentran restringidos a dichas áreas. <sup>(1, 14)</sup>

Los VPH inducen la formación de papilomas, que en su mayoría son crecimientos benignos fácilmente controlables. Sin embargo, los VPH de alto riesgo que infectan el tracto genital están asociados con el desarrollo del cáncer cervical, que es el tipo de cáncer que con mayor frecuencia afecta a la población femenina de nuestro país. <sup>(14)</sup>



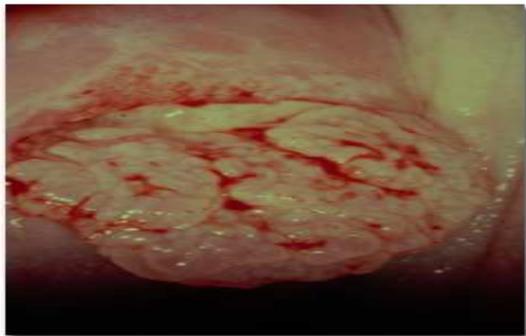
Los papilomas epiteliales se pueden localizar en cualquier parte del cuerpo aunque se presentan con mayor frecuencia en cara, manos y pies. Los papilomas orales afectan desde la boca y lengua hasta el esófago. Los papilomas genitales denominados “condilomas” se pueden localizar tanto en el aparato genital femenino (cuello uterino, vagina, vulva y ano), como masculino (pene y ano). Además, se han reportado papilomas respiratorios localizados generalmente en la laringe como resultado de transmisión placentaria de mujeres portadoras de VPH <sup>(1,6,)</sup>

Los VPH genitales son un agente de transmisión sexual que infectan el epitelio del tracto genital bajo, produciendo verrugas y papilomas. El proceso neoplásico asociado con el VPH no se limita al epitelio escamoso, sino que también está involucrado con el desarrollo de lesiones de células columnares. La infección por VPH produce cambios importantes en la morfología celular, como la formación de una amplia vacuola perinuclear, el núcleo agrandado, irregular e hipercrómico, y es posible encontrar binucleaciones, a estas células que han sufrido esta serie de cambios son conocidas como coilocitos. <sup>(20)</sup>

La manifestación morfológica más común de la infección por VPH es la verruga genital (*condyloma acuminatum*). **(Figuras 3-5)** Las verrugas genitales son comúnmente múltiples y ocurren con frecuencia en la vulva, extendiéndose hacia el portio vaginalis y el cérvix, también en el pene, produciendo lesiones filiformes pedunculadas que pueden coalescer produciendo masas similares a tumores. La verruga es esencialmente una hiperplasia epitelial benigna con acantosis y papilomatosis considerables. <sup>(14)</sup>



**Figura 3** Condiloma acuminado en pene  
Tomado de [www.aids.gov.br/dst/imagen47.htm](http://www.aids.gov.br/dst/imagen47.htm)



**Figura 4** Condiloma acuminado cervical.  
Tomado [www.ifcpc.org/colpo\\_basica/CAP6/631p.jpg](http://www.ifcpc.org/colpo_basica/CAP6/631p.jpg)



**Figura 5.** Condilomatosis.  
Tomado [www.ifcpc.org/colpo\\_basica/CAP6/631p.jpg](http://www.ifcpc.org/colpo_basica/CAP6/631p.jpg)

Sin embargo, la infección por VPH no siempre produce la formación de la lesión papilar típica, también puede producir lesiones conocidas como condiloma plano, que comparten las mismas características citológicas del condiloma acuminado, pero no se alzan sobre la superficie adyacente, por lo que no son visibles a simple vista. <sup>(14)</sup> (Figura 6-8)



**Figura 6.** Condiloma plano en pene  
Tomado [www.ifcpc.org/colpo\\_basica/CAP6/631p.jpg](http://www.ifcpc.org/colpo_basica/CAP6/631p.jpg)



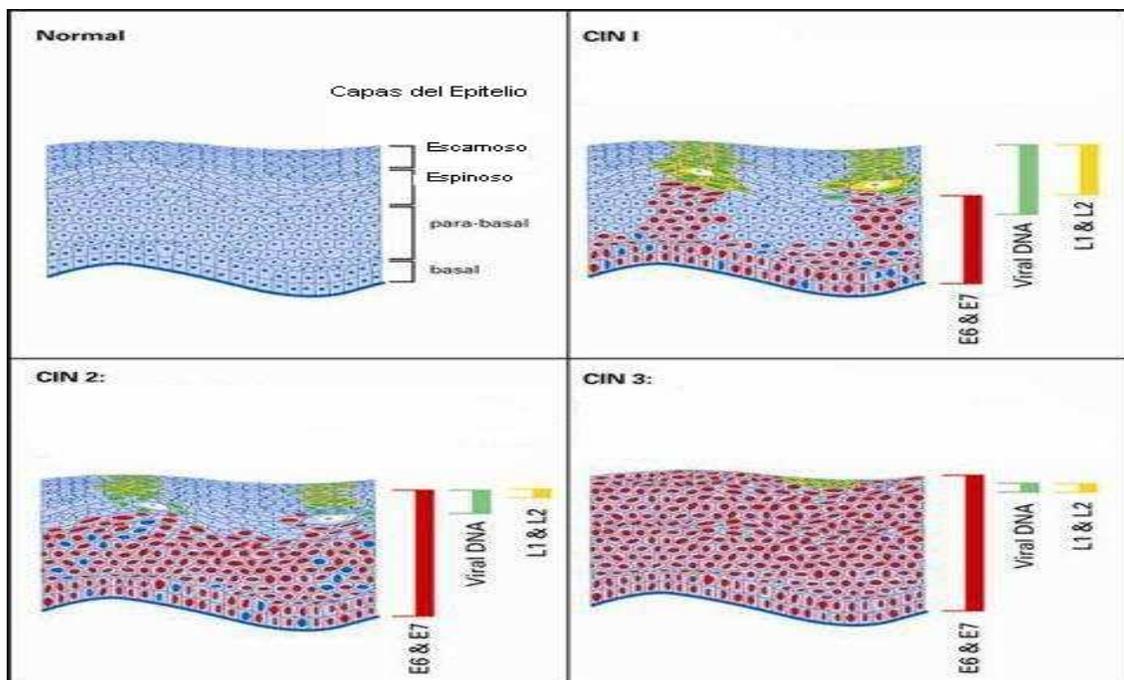
**Figura 7.** Condiloma Plano Cervical  
Tomado de  
[www.ginecolaser.com/images/colpo/images](http://www.ginecolaser.com/images/colpo/images)



**Figura. 8** Codiloma perianal  
Tomado [www.ifcpc.org/colpo\\_basica/CAP6/631p.jpg](http://www.ifcpc.org/colpo_basica/CAP6/631p.jpg)

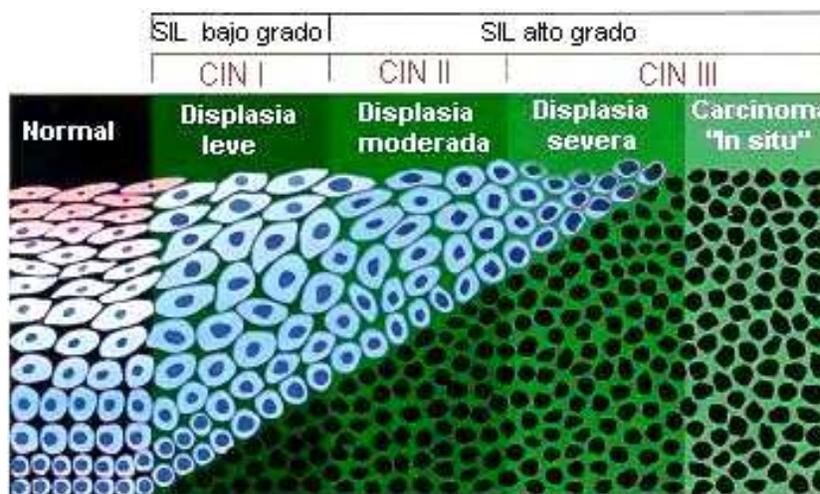
La mayoría de las infecciones por VPH desaparecen después de algunos meses posteriores al diagnóstico <sup>(1)</sup>. Las lesiones cervicales de bajo grado también tienden a regresar a la normalidad sin embargo, éstas también pueden progresar hacia lesiones de alto grado con un riesgo absoluto del 15-25% en el transcurso de 2 a 4 años, mientras que las lesiones de alto grado tienen una probabilidad del 50% de progresar a cáncer.

En la mayoría de los casos la progresión no es un fenómeno abrupto, sino que transcurre lentamente a través del desarrollo de lesiones pre-malignas y pre-invasivas. Dichas lesiones pre-malignas del cérvix son conocidas como neoplasia intraepitelial cervical (NIC) <sup>(14)</sup> (**Figura 9**)



**Figura. 9** La imagen muestra cada uno de los grados de neoplasia intraepitelial escamosa y la expresión de algunas proteínas virales. Tomada de [www.merckmedicus.com//hpvd/default.jsp](http://www.merckmedicus.com//hpvd/default.jsp)

Cuando estas modificaciones abarcan menos del tercio bajo del epitelio cervical se considera una NIC1; (**Figura 10**) cuando las células afectadas se extienden más allá del tercio bajo del epitelio, pero no abarcan el tercio alto se considera NIC2; mientras que NIC3 es la condición en la cual las células indiferenciadas, no estratificadas y basaloideas ocupan más de dos tercios, o incluso todo el espesor del epitelio cervical <sup>(14)</sup>.



**Figura. 10** Cambios que sufre el epitelio en los distintos grados de neoplasia Tomado de Taja-Chayeb L, M (1996)

El carcinoma micro-invasor es el estado inicial del cáncer cervical, en él las células neoplásicas han invadido la membrana basal del epitelio. Cuando las células malignas infiltran el endocérnix y se asocian para formar tumores exofíticos que pueden manifestar una ulceración superficial, se considera que se ha desarrollado un cáncer invasor, mismo que posee la capacidad de extenderse hacia los tejidos, vaginal, paracervical y parametrial adyacentes, para generar metástasis lejanas eventualmente. <sup>(14)</sup>

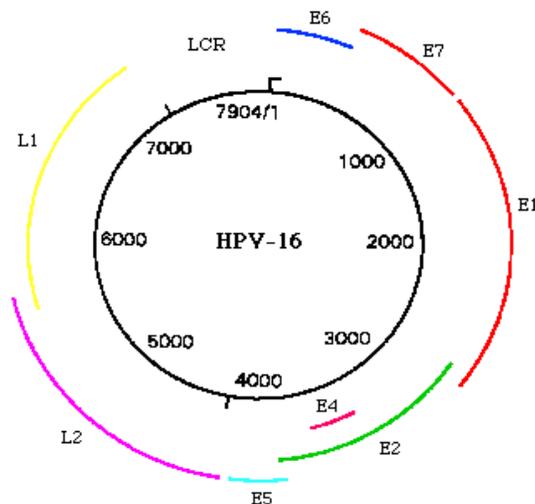


## 5. GENOMA VIRAL.

El genoma viral consiste de una doble cadena circular de DNA con una longitud aproximada de 8000 pares de bases, constituido por 8 genes y una Región Larga de Control (**RLC**) no codificante (**Figura 11**). Todas las secuencias encargadas de codificar a las proteínas virales denominadas ORFs (open reading frames= marcos de lectura abierta) están restringidas a una sola cadena.

A estas regiones se las designa con las letras **E** (por early = temprano) y **L** (por late = tardío), para indicar de esta manera su expresión durante el ciclo viral <sup>(1,3, 5, 6, 13, 21)</sup>.

La región Temprana (**E**) representa el 45% del genoma y contiene 6 marcos de lectura abierta que codifican para proteínas no estructurales, cuya función es controlar la replicación del DNA e inducir la transformación de la célula huésped. Estas proteínas son codificadas en las etapas tempranas de la infección y son conocidos como E. (E1, E2, E4, E5, E6 y E7). <sup>(1, 3, 5,13, 22.)</sup>



**Figura 11.** Mapa genético del Papilomavirus tipo 16

Tomada de <http://www.medescape.com>

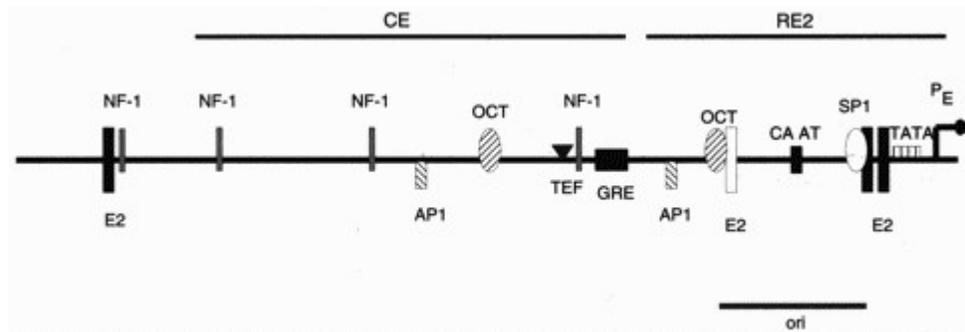


La región tardía (**L**), corresponde al 40% del genoma y contiene dos genes que codifican para proteínas estructurales de la cápside: L1, produce una proteína de 54,000 d que se produce en mayor cantidad, y la cual se encuentra muy conservada entre los diferentes tipos de VPH, y L2 que se produce en una menor cantidad, y es específica para cada tipo viral <sup>(1, 3, 6, 22)</sup>

La Región **RLC** corresponde al 15% del genoma viral y contiene los promotores que inician la replicación y controlan la transcripción. Esta se encuentra dividida en dos dominios principales: el RE2, regulado por la presencia de la proteína viral E2; y el dominio CE (celular enhancer), un fuerte potenciador de la transcripción que depende exclusivamente de factores transcripcionales celulares. <sup>(22)</sup>

En el dominio RE2 se encuentra el promotor temprano a partir del cual se transcriben los oncogenes E6 y E7. Posee una caja TATA funcional (a la cual se unen los factores necesarios e indispensables para iniciar la transcripción mediada por la RNA polimerasa II) y sitios de interacción de la proteína viral E2, además de sitios de unión para el factor celular Sp1 (proteína estimulante de la transcripción). En este dominio se ha descrito el origen de la replicación del DNA viral, dependiente de la presencia de las proteínas virales E1 y E2. <sup>(22)</sup>

La especificidad tisular de los papilomavirus reside en el CE, donde la participación conjunta de factores celulares promueve la actividad del promotor temprano exclusivamente en células de origen epitelial. Esta región se compone de numerosos sitios de asociación específica de diversos factores de transcripción de origen celular, tales como AP-1, NF-1/CTF, Octa-1, TEF, etc. (1). Además se ha descrito la presencia de un elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG) que puede ser inducida por hormonas esteroideas como la progesterona y dexametasona, que promueve la transcripción del DNA viral por un estímulo hormonal <sup>(6, 22)</sup>. **(Figura 12)**



**Figura. 12** Mapa Genético de la Región Larga de Control (RLC) de los VPH.  
Tomada de Álvarez-Salas LM (1995)

## 5.1. Función de Proteínas Virales

### 5.1.1. Proteínas de expresión temprana (E)

**E1:** Está implicada en el proceso de replicación viral. Controla la replicación episomal de DNA a través de la codificación de un modulador de (E1-M), y de un factor de replicación (E1-R). Mientras que esta zona del genoma se encuentre completa y funcional se produce una replicación viral, evitando la integración del DNA al genoma de la célula. Se activa una vez que se une a la proteína E2 para formar un heterodímero E1-E2 el cual se une a su vez a una región no codificante del VPH.

**E2:** Cumple una importante función, se encarga de la replicación y modulación de la transcripción viral. Puede estimular o reprimir la transcripción de genes virales (E6 y E7); ya que codifica un factor represor de transcripción (E2-TR) que inhibe la transcripción del promotor P97, el cual dirige la síntesis de E6 y E7. (3, 4, 6, 3,13,)

**E4:** Produce proteínas que se encargan de facilitar la encapsidación del genoma para formar las partículas virales. Favorece además la difusión y liberación de los viriones mediante la destrucción de los filamentos de citoqueratina de las células infectadas. Se cree que esta proteína inicia los cambios colocíticos en las células



epiteliales. Este gen se pierde cuando se integra el DNA viral al genoma de la célula.

**E5:** Produce una pequeña proteína de 44 aminoácidos que posee la capacidad de anclarse a nivel de las membranas celulares y activar a dos receptores de membrana: el EGFr (receptor para el factor de crecimiento epidérmico) y al PDGFr (receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas), retardando su endocitosis y aumentando su vida media. De esta forma E5 modifica la transducción de señales extracelulares y desregula la proliferación celular. La pérdida o mutación de esta región, evita la replicación episomal del DNA y favorece la integración del DNA al cromosoma.

**E6:** Es la proteína transformante mayor y tiene la capacidad de unirse a las proteínas celulares p53 y E6BP (E6 Binding Protein).

**E7:** Tiene al igual que E6 una actividad transformante. La proteína E7 de los VPH de alto riesgo poseen la capacidad de unirse con un alto grado de afinidad a la proteína retinoblastoma (pRb) producto del gen supresor de tumor retino blastoma (Rb).

### **5.1.2. Proteínas de expresión tardía (L)**

**L1:** Es la proteína mayor de la cápside, posee los antígenos específicos de género y algunos específicos de tipo. Esta proteína es la fuente para el desarrollo de vacunas.

**L2:** Es la proteína menor de la cápside, capaz de seleccionar al DNA viral y ubicarlo correctamente en el interior de la cápside <sup>(6,13)</sup>

Aparentemente las proteínas de L1 y L2 del VPH no participan en la inducción de lesiones



## 6. CICLO CELULAR

Para entender como interacciona E6 con P53 y E7 con RB es importante comprender el ciclo celular y sus mecanismos regulatorios. El ciclo celular se halla constituido por 4 fases o etapas denominadas G1, S, G2 y M. Las fases G1 y G2 son fases preparatorias donde se produce la síntesis de RNA y proteínas, durante la fase S se produce la síntesis y replicación del DNA y por último durante la fase M la célula entra en mitosis, se segregan los cromosomas y la célula se divide en dos. A su vez se designa como fase G0 a la fase en la cual la célula ya no se divide más o sale del ciclo celular y entra en estado de quiescencia.

La proliferación celular normal sigue esta secuencia ordenada de pasos (G1, S, G2 y M) (**Figura 13**) bajo un estricto control, permitiendo o impidiendo la progresión del ciclo celular. Existen varios puntos de control a lo largo del ciclo celular pero el lugar más importante de regulación y control se halla ubicado entre las fases G1-S y es en ésta transición de fases donde se hace la toma de decisión de si la célula se divide o no y si gasta energía en replicar su DNA. A este lugar se lo conoce como punto de control (checkpoint).

La progresión del ciclo celular a lo largo de sus fases se halla regulado por complejos moleculares de proteínas compuestos por dos subunidades, una con actividad catalítica denominada quinasa dependiente de ciclina CDK (porque no posee actividad quinasa a menos que esté asociada con una ciclina) y otra con una función reguladora sobre la anterior denominada ciclina (denominada así porque su concentración sufre fluctuaciones a lo largo del ciclo celular, se realiza una síntesis y degradación periódica, permitiendo de esta forma regular la actividad de las CDK).

Existen varios tipos de ciclinas, las cuales se designan con letras (Ciclinas A, E, D, B etc.) y varios tipos de CDK (CDK1, CDK2, CDK7 etc.) cada una relacionada con una fase específica del ciclo celular.



Cuando una célula normal recibe una señal para proliferar las ciclinas aumentan su concentración y se unen con las quinasas dependientes de ciclinas específicas formando un complejo ciclina/CDK activo, éstos se encargan de fosforilar distintas proteínas blanco que son cruciales para promover la progresión del ciclo celular como por ejemplo la proteína producto del gen supresor de tumor Rb (pRb).

Por otro lado existe una familia de pequeñas proteínas denominadas ICDK/C (inhibidores de los complejos ciclina/quinasas dependientes de ciclina) que se encargan de inhibir la actividad del complejo C/CDK y de esta manera detener la progresión del ciclo celular cuando se detecta alguna anomalía. Dentro de esta familia de proteínas inhibidoras se encuentran las proteínas p21, p27, p57, p15 etc.

La progresión del ciclo celular en esta forma armónica puede verse afectada por uno o varios factores que actuando en forma aislada o en conjunto llevan a la desregulación del mismo. En la transición de fase G1-S es donde se producen los cambios con consecuencias más peligrosas. A este nivel se pueden inactivar varias proteínas, ya sea por una mutación del gen o una inactivación funcional. En este punto las tres proteínas más importantes son la pRb, la p53 y la p21.

La proteína pRb es el producto del gen supresor de tumor Rb (denominado así por estar relacionado con el desarrollo del retinoblastoma), es una fosfoproteína nuclear que cumple un importante rol en el control de la división y la diferenciación celular. La proteína presenta en su parte central una estructura en forma de hendidura o bolsillo que le permite secuestrar factores de transcripción nuclear tales como el E2F y DP1, estos factores son necesarios para la progresión del ciclo celular y conducir la maquinaria de replicación del DNA. La función de la proteína pRb, cuya concentración permanece fija a lo largo de todo el ciclo celular a diferencia de las ciclinas, es regulada en base a su estado de fosforilación.

De esta manera la proteína pRb se encuentra bajo dos formas: subfosforilada e hiperfosforilada; en el primer caso la proteína se encuentra en su forma activa, secuestrando a los factores de transcripción E2F y DP1 y actuando de esta forma como un freno para el ciclo celular. Por otro lado si la célula recibe una señal para dividirse, el complejo ciclina/ quinasa dependiente de ciclina se encarga de fosforilar a la proteína pRb la cuál pasa a su forma inactiva (hiperfosforilada), liberando del bolsillo o hendidura a los factores de transcripción que son necesarios para las fases siguientes del ciclo celular.

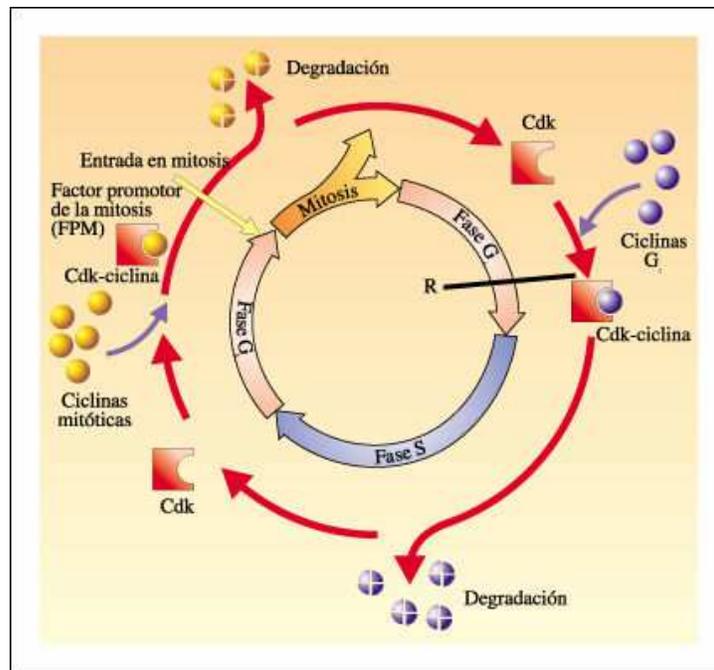


Figura.13 Ciclo Celular Tomada de [www.educa.aragob.es//](http://www.educa.aragob.es/)



La proteína p53 (denominada así por su peso de 53 kDa) es el producto de un gen supresor de tumor P53. Es una fosfoproteína nuclear siendo su principal función controlar la progresión del ciclo celular monitoreando la integridad del DNA. La concentración de la proteína p53 en células normales es baja pero su nivel sufre un rápido incremento cuando se detecta algún tipo de daño que afecte al DNA y por lo tanto a la integridad del genoma. Una vez detectado el daño, p53 actúa como un factor de transcripción que se encarga de activar o reprimir genes necesarios para solucionar problemas tales como los encargados de detener el ciclo celular, reparar el daño al DNA o iniciar el proceso apoptótico. Si p53 detecta un daño en la secuencia de nucleótidos del DNA y este daño es reparable, activa la transcripción de varios genes de los cuales el más importante es el P21 que codifica la proteína p21 (perteneciente a la familia de inhibidores de los complejos Ciclina/ CDK), esta proteína se encarga de regular el ciclo celular en forma negativa en la transición de fase G1-S inhibiendo al complejo ciclina/CDK que queda incapacitado para fosforilar a la proteína pRb para inactivarla y permitirle liberar los factores de transcripción nuclear necesarios para la progresión del ciclo celular (E2F y DP1), deteniendo en esta forma al ciclo celular.

Si el daño al DNA es extenso o si es irreparable, p53 activa otros genes los cuales a su vez se encargan de activar los mecanismos que llevan a la muerte por apoptosis de esa célula, evitando de esta manera que el daño sea transmitido a la descendencia. En el caso que el daño al DNA no se repare y la célula logre completar un ciclo de división, este daño suele ser fijo y permanente y por lo tanto estar presente en toda la descendencia de la célula. La p53 actúa así como un guardián del genoma impidiendo que se acumulen mutaciones que podrían llevar a la transformación celular neoplásica <sup>(13)</sup>



## 6.1 Interacción de los Genes E6 y E7 con p53 y Rb

En una célula, **p53** actúa en respuesta al DNA dañado. E6 posee una gran afinidad por la proteína p53 a la cual se une y favorece su degradación proteolítica a través de la vía de la ubiquitina-proteosoma 26S. Este es un mecanismo no lisosomal encargado de degradar proteínas blancas que previamente han incorporado moléculas de ubiquitina; una vez modificada la proteína, ésta es reconocida por un complejo multiproteico denominado proteosoma 26S que cataliza la degradación de la proteína poliubiquitinada. En el caso de la proteína p53 la proteólisis solo se produce si se une previamente a una proteína celular denominada E6BP, que se encarga de transferir directamente la actividad ubiquitina sobre el sustrato (p53).

La degradación de la proteína p53 no permite que la célula detenga el ciclo celular en G1 ante la presencia de un daño reparable al DNA o activar el proceso de apoptosis ante un daño irreparable al genoma, lo que permite que el virus se apropie de la célula y se reproduzca a sí mismo. Esta propiedad de la E6 no la poseen los VPH de bajo riesgo.

Esta forma de inactivación de la proteína p53 se denomina **inactivación funcional** y sería el equivalente a una mutación que afecte al gen P53, tal como se encuentra en la mayoría de las neoplasias malignas. Esto ocurre cuando no hay regulación de la expresión de E6 por la proteína E2, por la integración del genoma viral al celular.

Además de bloquear el gen p53 celular, la proteína E6 viral activa a la telomerasa, enzima que sintetiza las secuencias repetitivas del telómero. La activación de esta enzima conserva un ciclo celular continuo que sigue produciendo células virales.

**Rb** produce los factores de transcripción necesarios para el avance a través del ciclo celular. Esto impide que el ciclo celular prosiga hasta que se hayan acumulado suficientes proteínas, en especial la E2F. Cuando el VPH infecta una célula, la unión de E7 con pRb permite que esta última libere precozmente factores de transcripción nuclear como E2F y DP1, que se encontraban en la hendidura o



bolsillo de la misma, estos transactivan a los genes que codifican a las proteínas implicadas en la síntesis del DNA y de la progresión del ciclo celular. Además E7 activa a los complejos cdk2/ciclina E en G1 y G1/S y a los complejos cdk2/ciclina A en la fase S.

Mediante estos mecanismos la proteína E7 de los VPH de alto riesgo evita que las células epiteliales suprabasales abandonen el ciclo celular incrementando de esta manera el pool de células en proliferación. En tanto E7 permanezca fijo a Rb, el ciclo celular continuará, causando así un ciclo de reproducción celular anormal, que se vuelve maligna cuando la integración al genoma se altera y se desregula la expresión de E7. (3, 4, 6 13, 23)

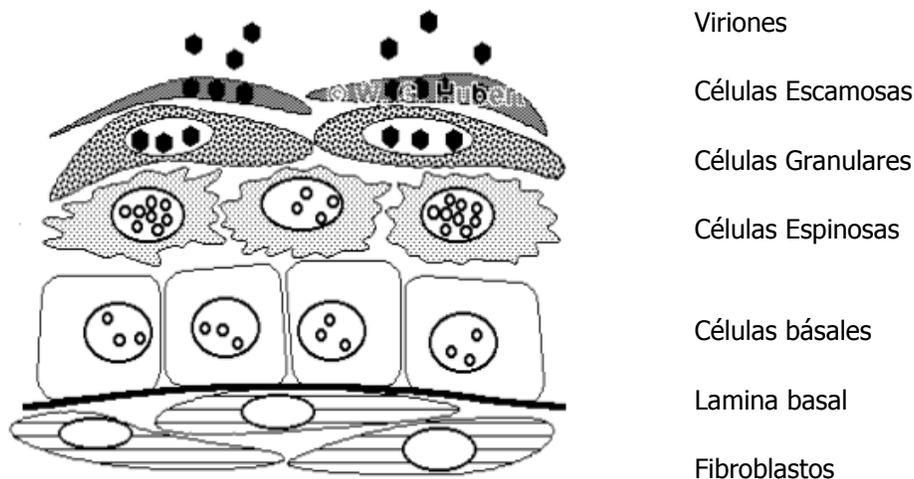
## 7. CICLO DE REPLICACIÓN.

El ciclo de los VPH esta estrechamente ligado al crecimiento y diferenciación de las células epiteliales hospederas. El VPH inicia su ciclo productivo infectando a las células basales del epitelio de la zona de unión escamo-columnar que son células poco diferenciadas de las capas basales del epitelio, donde inicia la transcripción de sus genes, esto es posible a través de pequeños microtraumas durante el coito, lesiones o abrasiones del tejido que determinarían una solución de continuidad a nivel epitelial permitiendo el acceso del virus a las células basales donde existirían receptores para el mismo, pertenecientes a la familia de las integrinas<sup>(1,13,14)</sup>.

Se ha propuesto a la  $\alpha 6$ -integrina como el receptor epitelial celular para el VPH-6, aunque no es el mismo para VPH11 y VPH-33. El VPH-16 y VPH-33 se fijan a sus células hospederas vía heparan sulfato de la superficie celular (via cell surface heparan sulfate). También se sugiere la presencia de un segundo receptor o estabilizador de proteoglicanos que puede estar implicado en la fijación del VPH (4). Una vez dentro de la célula huésped se inicia la replicación viral en las células basales. El DNA viral permanece en estado episomal, replicandose a niveles muy

bajos en coordinación con la división celular. Cuando las células infectadas se diferencian y migran desde la capa basal hacia el estrato espinoso del epitelio, la replicación viral se estimula, produciendo la acumulación de viriones dentro del núcleo y haciendo más fácil su detección. <sup>(1, 6)</sup>

El ensamble de los viriones se lleva a cabo en estratos superiores de los epitelios cuando las células se han diferenciado (células granulares), ya que es un requisito para este evento la maduración y diferenciación de la célula. Finalmente en las células escamosas los viriones son expulsados y pueden iniciar un nuevo ciclo de infección <sup>(24)</sup> (**Figura 14**).



**Figura. 14.** Ciclo de vida del Papilomavirus Humano. Tomado de Taja-Chayeb L, M (1996)

Una vez que el VPH infecta a las células basales el genoma viral puede ser encontrado ya sea en forma episomal o integrado al genoma de la célula huésped de acuerdo al tipo de VPH (bajo o alto riesgo).

En el condiloma y en las lesiones benignas de bajo grado (LSIL) generalmente, el DNA viral permanece en las células epiteliales en forma libre como un plásmido (episomal), utilizando a las proteínas del huésped para la replicación y transcripción



de su genoma y este proceso continúa hasta que la célula infectada muere o se descama liberando a las partículas virales. La integración es un hecho raro de observar en LSIL o displasias leves. En cambio, en la mayoría del cáncer de cervical y lesiones de alto grado el DNA viral se integra en forma estable al genoma de la célula huésped, alterando el medio ambiente de los genes virales y el control de su expresión <sup>(13)</sup>. También se ha visto en tejidos con cáncer que pueden estar presentes ambas formas al mismo tiempo; episomal e integración del DNA viral a la célula huésped. Aunque la integración parece ocurrir con mayor frecuencia en cáncer cervical asociado al VPH 18 que en el VPH 16 <sup>(4)</sup>.

## **8. CARCINOGENESIS.**

Actualmente existe suficiente evidencia para implicar en forma directa a ciertos tipos VPH como el factor más importante en la génesis del cáncer cervicouterino y otras neoplasias ano-genitales.

La carcinogénesis (proceso por el cual la célula normal se convierte en una célula transformada) requiere de mucho tiempo y en el caso del cáncer cervicouterino se estima que es en varios años e inclusive décadas

En general el cáncer se origina como consecuencia de un acúmulo desorganizado de células, y esta se puede producir por dos mecanismos:

- A) proliferación en forma incontrolada por una desregulación del ciclo celular
- B) desregulación en el proceso apoptótico o de muerte celular programada.

Esta dicotomía no es estricta y en muchas formas de cáncer se encuentra superposiciones de ambos procesos <sup>(13)</sup>



Las mutaciones deben afectar a genes específicos relacionados con el desarrollo del cáncer, por medio de un aumento de su función (oncogenes) o pérdida de la misma (genes supresores de tumor). Los genes cuyas mutaciones contribuirán con el desarrollo del fenotipo neoplásico se agrupan en 5 categorías. (**Tabla 4**)

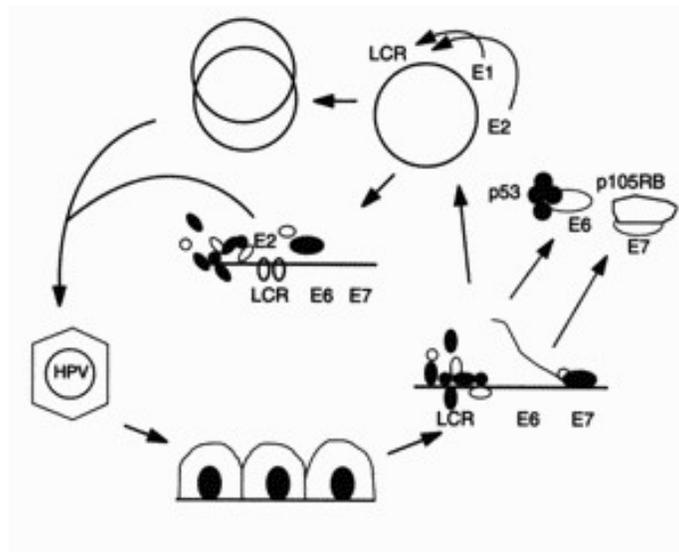
<b>Tabla 4. Genes relacionados con el desarrollo del cáncer</b>
1. Oncogenes
2. Genes supresores de tumor
3. Genes reguladores de la muerte celular programada (apoptosis)
4. Genes de reparación del DNA
5. Genes de la inmortalización celular

**Tabla 4** Tomada de Osvaldo Mateo Spinelli. (2000)

Las mutaciones que afectan a estos genes deben ser estables y para que una mutación se convierta en estable y pase a la descendencia, la célula debe por lo menos tener una división celular antes que el daño génico sea detectado y reparado.

En el cáncer cervicouterino se produce una situación especial, al comienzo del proceso carcinogénico no hay una mutación o un daño genético que afecte a un gen determinado, en su lugar se produce una **inactivación funcional** del producto de ese gen por interacción con ciertas proteínas, (la interacción entre proteínas puede inactivar a una de ellas o favorecer su rápida degradación y de esta forma anular su función). En los VPH de alto riesgo las proteínas virales E6 y E7 interactúan con las proteínas celulares p53 y pRb respectivamente, determinando su degradación o inactivación <sup>(13)</sup>

La carcinogénesis de los VPH genitales es compleja y depende en gran parte de factores de la célula huésped (**Figura 15**). El virus en la fase temprana del ciclo produce las oncoproteínas E6 y E7, las cuales interactúan con los reguladores celulares p53 y RB respectivamente inactivándolos. Debido a que estos dos genes participan de manera importante en el control del ciclo celular, estos eventos favorecen el crecimiento descontrolado de las células y la transición maligna en el cáncer cervicouterino <sup>(6)</sup>. Más tarde se producen las proteínas E1 y E2, esenciales para la replicación del genoma viral.



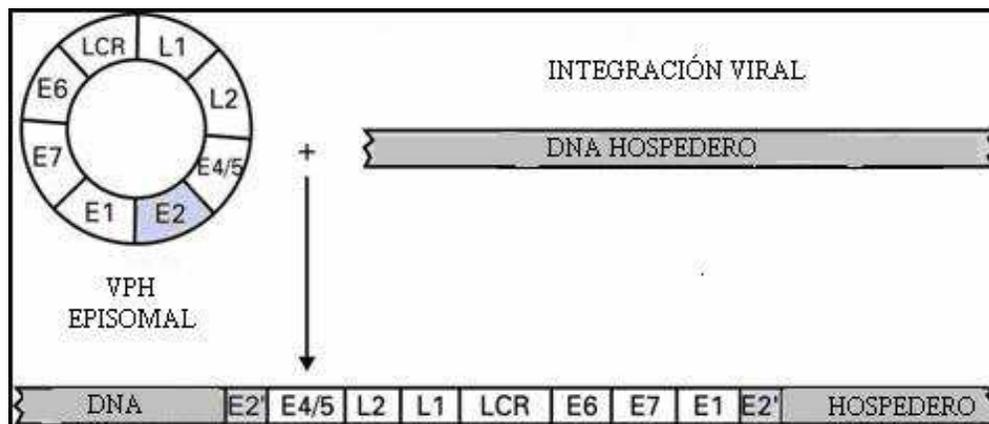
**Figura. 15.** Mecanismos involucrados en la carcinogénesis del Papilomavirus Humano  
Tomada de Álvarez-Salas LM (1995)



Se sabe que los oncogenes E6 y E7 pueden ser regulados negativamente, dependiendo de la presencia de la proteína E2, que también es codificada por los VPH. Esta proteína se une a la región promotora (LCR) que regula la expresión de las proteínas E6 y E7 y ocasiona su represión. A fin de permitir la diferenciación necesaria para la síntesis de las proteínas tardías (L1 y L2) y el ensamble viral <sup>(25)</sup>.

Generalmente, después de una infección por papiloma virus de alto riesgo, el DNA viral que es circular se integra al genoma celular, se abre y adopta un patrón lineal causando una ruptura que afecta la mayoría de las veces a la región de los genes E1-E2, y el rompimiento del gene E2, en dos partes (**Figura 16**) y como resultado da lugar a que se produzcan niveles extremadamente altos de las proteínas E6-E7, por lo tanto el descontrol de la división celular que se ve en el cáncer cervical. En algunos casos esto puede ir acompañado además de deleciones, mutaciones o rearrreglos en el genoma viral <sup>(12, 13)</sup>

La integración del DNA viral en el DNA de la célula huésped ocurre al azar, no existiendo un lugar predeterminado para su integración. El sitio en el genoma al cual el DNA viral se integra no es esencial para el proceso de carcinogénesis, mientras que el sitio en el cual se interrumpe el DNA viral sí lo es (región E1/E2). <sup>(13)</sup>



**Figura. 16** Integración viral a la célula hospedera con la ruptura de E2. Tomado de Münger K (2004)

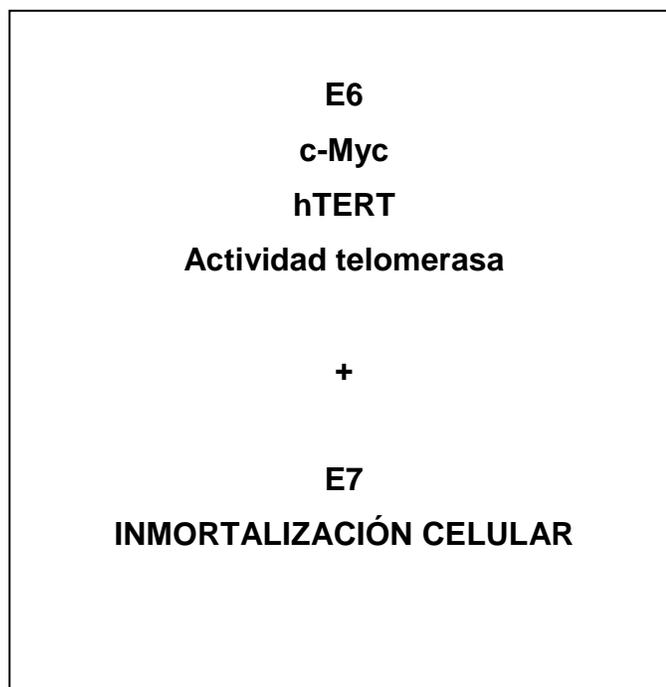


## **8.1 Inmortalidad de Células Tumorales**

La inmortalidad, se logra mediante la reactivación de una enzima denominada telomerasa. En condiciones normales, las células no se dividen indefinidamente debido a un proceso denominado senescencia replicativa o celular. Este proceso se produce porque a medida que las células se dividen, éstas sufren un proceso de acortamiento en los extremos de sus cromosomas denominados telómeros, los cuales son necesarios para mantener la estabilidad e integridad de los mismos. Una vez que las células alcanzan un número determinado de duplicaciones celulares (50 a 60), el acortamiento de los telómeros llega a un límite crítico y peligroso; por lo que la célula entra en proceso de senescencia y muere por apoptosis. Algunas células como las germinales, las pluripotenciales etc., que deben transmitir a la descendencia la totalidad de la información genética, poseen activada una enzima denominada telomerasa la cual se encarga de alargar a los telómeros cada vez que la célula se divide y mantener de esta forma constante la longitud de los cromosomas.

Los VPH logran activar a la telomerasa por medio de las dos proteínas transformantes E6 y E7. La expresión desregulada de E6 lleva a la activación del oncogen c-myc, el cual incrementaría la transcripción del mRNA que codifica la subunidad catalítica de la telomerasa, conocida con el nombre de hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase). (**Figura 17**)

Por otro lado, la proteína E7 conjuntamente con la proteína E6 cooperaría con la telomerasa para inducir la inmortalización celular. <sup>(13)</sup>



**Figura 17** Inmortalidad Celular Tomada de Tomada de Osvaldo Mateo Spinelli. (2000)

## **9 RESPUESTA INMUNE AL VPH**

### **9.1 Producción de Anticuerpos. (Ac)**

La infección cervical por VPH da lugar a la producción de Ac en la mitad de 2/3 de las mujeres infectadas pero el índice de seroconversión es lento y la respuesta de los Ac es baja. En un estudio de 608 estudiantes (edad media 20 años), se encontró que la infección cervical con VPH-16 dio lugar a seroconversión de IgG aproximadamente 8 meses después de que el DNA de VPH fuese detectado; mientras que IgA ocurre 14 meses después de la infección. Solamente 56.7% de las mujeres fueron seropositivo para IgG y 37% para IgA y la duración media medida por ELISA fue aproximadamente de 3 años.<sup>(26)</sup>



Otro reporte muestra que los niveles de anti-VPH IgG eran en corto plazo estable incluso después de una década.

La respuesta más grande de Ac medida en personas infectada con VPH es hacia la proteína L1 en partículas de virus o virus recombinante como partículas.

El papel de Ac es la prevención de la infección inicial. Se ha demostrado en modelos animales, pero en seres humanos no hay estudios definitivos del papel del Ac. Sin embargo, los Ac contra VPH pueden prevenir la infección inicial en las células epiteliales basales.<sup>(27)</sup>

IgG e IgA en las secreciones mucosas pueden atar a las partículas virales del VPH y quizás prevenir el acceso a las células epiteliales de la mucosa. Los niveles de Ac necesarios para la protección contra la infección no se han determinado. No es claro el papel de IgA en la infección ya que el líquido cervico vaginal contiene más IgG que IgA, y una proporción significativa de IgG en las secreciones del tracto genital es derivado de la circulación plasmática.

## **9.2 Reacción Cruzada de Ac entre Diferentes Tipos de VPH.**

Los Ac formados después de la infección con un tipo de VPH, usualmente no captura otros tipos de VPH. La infección anterior con un tipo de VPH no parece prevenir la infección contra otro tipo de VPH, se sugiere que en general diversos tipos de VPH corresponda a diferentes serótipos y que la inmuno respuesta a un tipo de VPH no protege contra otros. Una excepción son los tipos VPH-6 y VPH-11 que contienen epitopes compartidos en su cápside, los Ac formados después de la infección contra VPH-6 pueden proteger parcialmente una infección contra VPH-11 y viceversa.<sup>(28)</sup>



## 10 DIAGNÓSTICO

### 10.1 Métodos Convencionales

10.1.1 Citología (papanicolaou)

10.1.2 Colposcopia

10.1.3 Histología: Alteraciones del tejido celular (Coilocitos)

### 10.2 Métodos Moleculares

10.2.1 Captura de Híbridos: Hibridación con sondas específicas y su detección por quimioluminiscencia

10.2.2 PCR: Amplificación de una región específica

10.2.3 RT-PCR: Amplificación en tiempo real.

### 10.1 Métodos Convencionales

#### 10.1.1. Citología

El método diagnóstico más ampliamente usado para la detección oportuna del cáncer cervico-uterino es la citología, conocida como prueba del Papanicolaou. La prueba estudia los cambios microscópicos a nivel celular, en células obtenidas de un raspado de la pared cervical, que son posteriormente colocadas en una laminilla, fijadas, teñidas y estudiadas al microscopio. La presencia de coilocitos es el indicador clave de una infección por VPH, sin embargo el grado de avance de la lesión debe ser confirmado por un estudio histopatológico. **(Figura 18)** <sup>(14)</sup>





La terminología utilizada en el diagnóstico citológico de las lesiones cervicales pre-malignas es el sistema Bethesda. (**Tabla 5**)

**Tabla 5.** Equivalencia entre las diversas nomenclaturas usadas en citología e histología

Sistema Bethesda	Descripción	Clasificación. Papanicolaou	Clasificación. Histológica
ASCUS	Atipia Escamosa	Papanicolaou clase II	NIC I
LSIL	Displasia media, coilocitosis	Papanicolaou clase III	
HSIL	Displasia Moderada a severa	Papanicolaou clase IV	NIC II NIC III
		Papanicolaou clase IV	NIC III Carcinoma in situ

**Tabla 5.** Adaptado de Jastreboff AM. (2002)

### Desventajas de la Citología

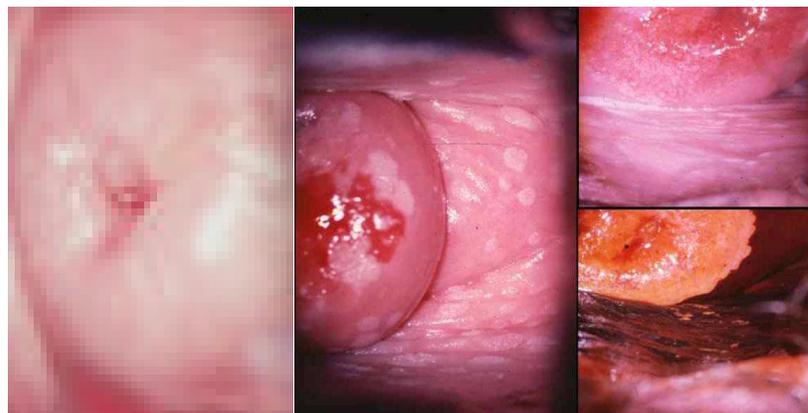
Necesita ser realizada por especialistas con experiencia, Las más importantes son la falta de calidad de la toma de muestra, y la mala calidad del frotis; perjudicando a la interpretación adecuada, dando lugar a un gran numero de falsos negativos. <sup>(20)</sup>

Muestras con alteraciones o anomalías citológicas diagnosticadas como ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado) que su interpretación y manejo clínico de estas pacientes genera confusión y controversia. La amplia variabilidad en la interpretación y la amplitud del significado del término atípico lleva a los clínicos o médicos a controlar esos extendidos con colposcopia, como un recurso para descartar la posibilidad de un resultado falso negativo, colposcopias innecesarias. <sup>(20, 29, 30, 31)</sup>

El Papanicolaou puede no detectar aproximadamente un 10 a 15% de los cánceres y lesiones intraepiteliales de alto grado (CIN); en ocasiones, la cifra podría elevarse del 40% hasta el 60% <sup>(32, 33)</sup>

### 10.1.2 Colposcopia

Es un método de ayuda diagnóstica para evaluar pacientes con citologías anormales que valora sobre todo los cambios a nivel de la superficie del cérvix. Consiste en la visualización de áreas específicas del epitelio, gracias a la reacción producida por la aplicación de ácido acético diluido 3 ó 5% sobre el tejido afectado. En los epitelios dañados hay un aumento de la permeabilidad de la membrana celular, lo que permite que el ácido penetre y cause aglutinación de proteínas, fenómeno responsable la formación de zonas blanquecinas (lesión acetoblanca) temporales, que sugieren la infección por el VPH. **(Figura 19)** La visualización de tales zonas se hace a través de un colposcopio, y esta técnica es normalmente usada como una herramienta para la toma dirigida de biopsias a ser analizadas por histopatología, y posteriormente para el tratamiento de las lesiones. <sup>(14)</sup>



**Figura 19.** Imágenes colposcópicas la primera muestra un cérvix Normal y las otras donde se ve la reacción de ácido acético que muestra zonas blanquecinas.

Tomada de <http://www.ginecolaser.com>



## **Desventajas de la Colposcopia**

También la Colposcopia, necesita ser realizada por especialistas con experiencia, mantiene errores de interpretación preocupantes. La subjetividad y variabilidad interobservador son la causa de que gran número de imágenes colposcópicas no concluyentes sean innecesariamente biopsiadas, aumentando el sobre diagnóstico y sobret ratamiento de lesiones transitorias mínimas que simulan CIN (neoplasia intraepitelial cervical).

Los estudios realizados demuestran que la Colposcopia no es lo suficientemente específica para distinguir las lesiones intraepiteliales de los cambios metaplásicos y/o acantóticos; solamente un 20% de las zonas de transformación anómala evaluadas en la rutina colposcópica corresponden histológicamente a lesión intraepitelial.

Las pacientes con PAP anormal, a las que se les efectúa biopsia por epitelio blanco al ácido acético, tienen el riesgo de ser tratadas por una lesión que no es tal porque: “no todo lo blanco es VPH.”<sup>(34)</sup>.

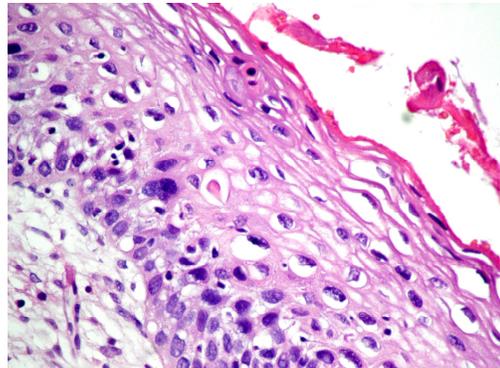
El aumento de densidad celular, expresada como epitelio blanco al ácido acético, puede presentarse en una gran variedad de condiciones epiteliales que van desde las lesiones intraepiteliales, hasta los epitelios benignos escamosos acantóticos no glucogénicos, la metaplasia inmadura y las anomalías inducidas por procesos inflamatorios; asimismo el punteado y el mosaicismo, no representan específicamente un engrosamiento epitelial ni atipia nuclear. Esta falta de especificidad en la evaluación colposcópica, genera confusión por la falta de correlación colpo-histológica y ansiedad en la paciente.<sup>(34,35,36.)</sup>

### 10.1.3 Histología

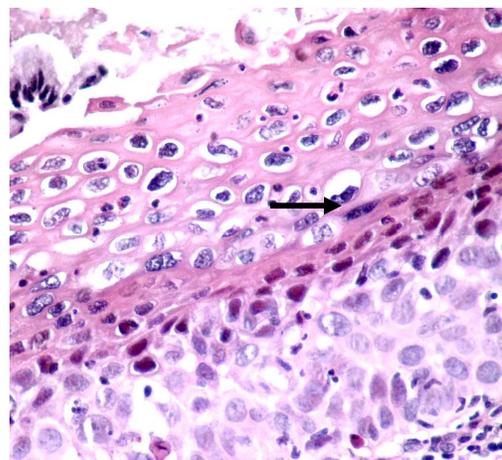
El diagnóstico histopatológico se logra al estudiar al microscopio fragmentos de tejido cervical obtenidos a partir de una biopsia. Este estudio permite diferenciar los estratos del epitelio cervical, detectando así el nivel de infiltración de las células infectadas, así como áreas de invasión.

**Figura 20.** Imagen microscópica, se observa una lesión intraepitelial escamosa de bajo grado, displasia leve NIC I asociada a cambios compatibles con infección por VPH.

La capa de células basales muestra ensanchamiento que está limitado al tercio inferior del espesor del epitelio (40X). Imagen de corte histológico de la muestra (H-4797)

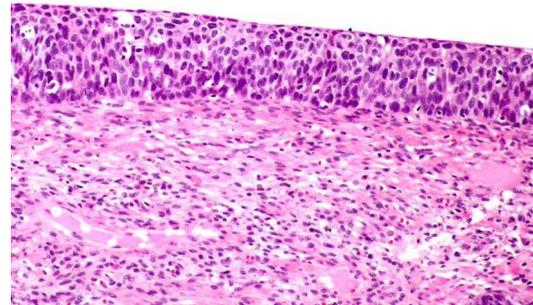


**Figura 21.** Imagen microscópica donde se muestra una Lesión escamosa intraepitelial de alto grado NIC II, más infección por VPH. Células intermedias coilocíticas con núcleos atípicos en una displasia cervical moderada (40X). Imagen de corte histológico de la muestra (H-1287)





**Figura 22.-**Imagen microscópica, se observa un carcinoma epidermoide in situ con penetración glandular / (NIC III) / lesión intraepitelial de alto grado. Irregularidad en la polaridad nuclear (40X). Imagen de corte histológico de la muestra (H-6117)



### **Desventajas de la Histología.**

Dificultad para los patólogos para diagnosticar lesiones de bajo grado asociadas a VPH. Diagnóstico erróneo de lesión por VPH debido al sobrediagnóstico de halos perinucleares, la carga glucogénica, la forma, la cromasia y/o el agrupamiento celular, que induce a un tratamiento innecesario puede tener complicaciones <sup>(37)</sup>.

## **10-2 Métodos Moleculares para la Detección del VPH.**

### **10.2.1 Captura de híbridos**

El Sistema de Captura Híbrida (HCS), es una prueba de hibridización con señal de amplificación, que ha sido desarrollado por Digene Corporation y aprobado por la FDA (Food and Drug Administration de los EE.UU.)

Es una técnica para la detección del DNA viral que utiliza un método colorimétrico para la determinación de muestras humanas positivas a la presencia del virus. La captura de híbridos se basa en la formación de híbridos de moléculas de DNA viral con sondas específicas de RNA, estos híbridos se exponen al reconocimiento de



anticuerpos especialmente diseñados y que se encuentran acoplados a moléculas coloridas, las que son finalmente detectadas en un luminómetro. (**Figura 23**)

La captura de híbridos esta diseñada para detectar grupos virales, de bajo y/o de alto riesgo con una sonda específica para cada uno. Dentro del grupo de bajo riesgo identifica los tipos virales 6, 11, 42, 43, 44; y para el grupo de alto riesgo: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68. Los pasos de esta técnica comprenden 5 y son:

- Desnaturalización: liberación del DNA de las células y apertura de la doble hélice.
- Hibridación: Exposición de DNA de la muestra con las sondas para cada grupo, en presencia del virus se forman los híbridos DNA: RNA.
- Captura: Los híbridos de DNA: RNA son fijados en una microplaca o en un tubo de captura a través de anticuerpos.
- Detección: Se agregan anticuerpos que reconocen y se enlazan con los híbridos, estos anticuerpos tienen acoplados enzimas que reaccionarán con un sustrato quimioluminiscente.
- Amplificación de la señal: Adición del sustrato a la muestra, la reacción que se lleva a cabo produce luz por lo que es detectable en un luminómetro <sup>(38)</sup>



**Figura 23** Pasos en la metodología por Captura de Híbridos  
[www.digene.com/labs/labs\\_hybrid.htm](http://www.digene.com/labs/labs_hybrid.htm)

La muestra se toma en un medio de transporte especial llamado digine, que contiene el cepillo endocervical para la toma. Este mismo medio se utiliza para la detección y el genotipo de VPH por PCR provenientes de raspados (**Figura 24**)

### **Desventajas de Captura de Híbridos.**

Después de recientes mejoras en esta técnica se demostró que 1pg/ml valor de corte equivale a 100,000 copias virales/ ml. <sup>(38)</sup>

Experiencias realizadas mundialmente desde inicios del 90, han demostrado que este test tiene una sensibilidad que varía entre el 70% al 96.8% <sup>(15)</sup>.



**Figura 24** Kit de toma de muestra para Captura Híbrida, Detección por PCR y Genotipo VPH.  
Tomado de [www.digene.com/labs/labs\\_hybrid.htm](http://www.digene.com/labs/labs_hybrid.htm)

### 10.2.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

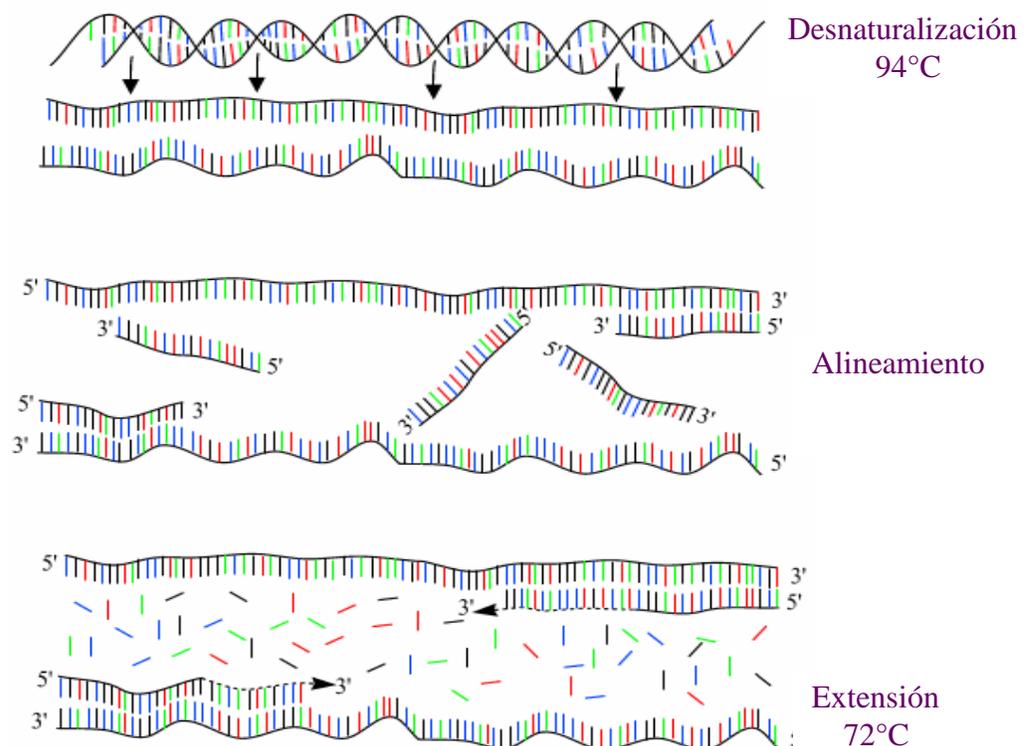
El inventor de esta interesante técnica fue Kary Mullis por la cual se le adjudicó el Premio Nobel de Química en 1993. Utilizó la PCR para la amplificación del gen de la  $\beta$ -globina humana.

La PCR permite la detección de cantidades ínfimas de ácidos nucleicos (DNA y RNA), mismos que se localizan específicamente, o incluso si se encuentran mezclados con millones de hebras de DNA o RNA de la célula hospedera. Es una técnica simple y muy rápida de multiplicar el DNA presente en diferentes muestras biológicas, obteniéndose millones de copias de una determinada secuencia de DNA.

La PCR en la detección del VPH es una técnica específica y sensible que permite la detección genérica de un amplio número de tipos de VPH, o que puede también ser utilizada para la detección específica de un solo tipo viral. <sup>(39)</sup>

Hay tres pasos importantes en una PCR: Desnaturalización, Alineamiento y Extensión (**Figura 25**).

- 1.- **La Desnaturalización**, es el proceso mediante el cual la doble cadena de DNA es separada y se lleva a cabo a  $94^{\circ}\text{C}$ .
- 2.- **El alineamiento**, temperatura a la cual los primers o iniciadores específicos para la secuencia de DNA que se quiere detectar, reconocen su complemento y se alinean; la temperatura a la que sucede esto depende de la secuencia de los mismos.
- 3.- **La Polimerización** o Extensión de Iniciadores, es el paso el cual se forma la cadena completa de DNA a partir de los iniciadores que reconocieron la secuencia. Las bases van reconociendo su complemento y de esta manera se extiende el fragmento que posteriormente será detectado.



**Figura 25** Técnica de PCR. Tomada de [users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html](http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html)

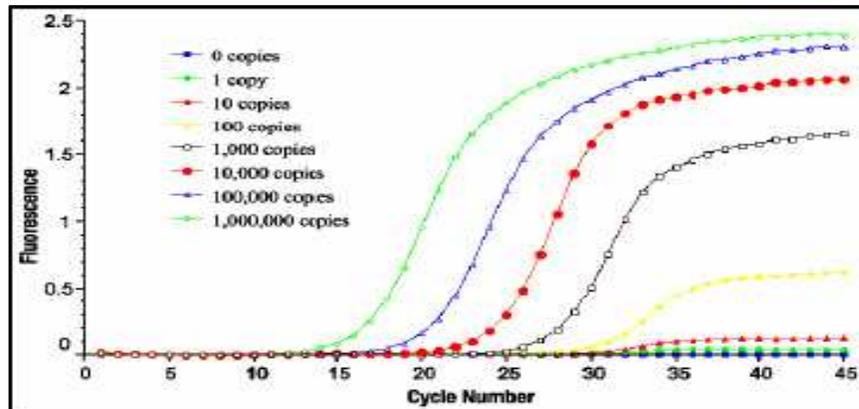
Este proceso se repite 30 o 40 ciclos en un tiempo corto y nos permiten obtener una amplificación exponencial (**Figura 26**) de la secuencia específica que se pretende detectar en un equipo o mediante geles; Esto se hace en un termociclador automatizado, que puede calentar y enfriar los tubos con la mezcla de reacción <sup>(39)</sup>.



**Figura 26.** Amplificación exponencial mediante la técnica de PCR.  
Tomada de [users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html](http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html)

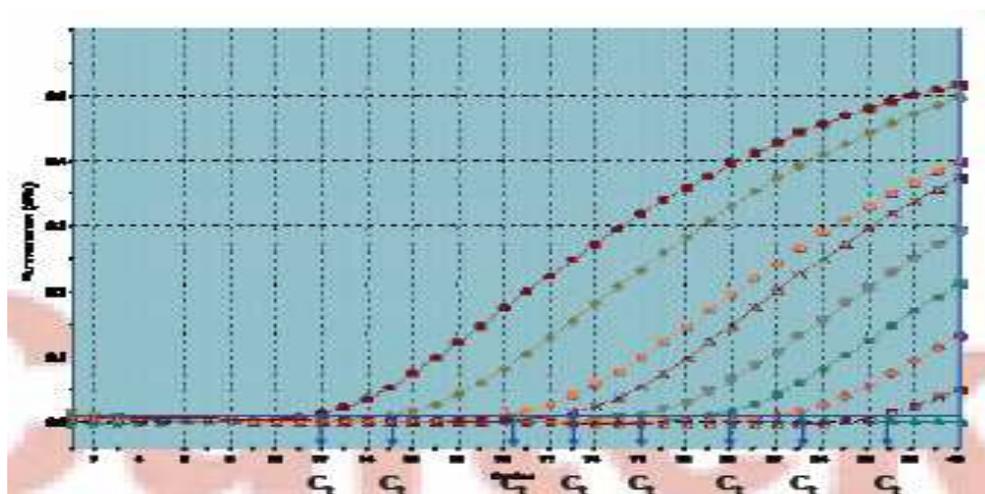
### 10.2.3 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

La PCR en Tiempo Real es, básicamente, una PCR convencional en la que los equipos de amplificación (termocicladores) llevan incorporados un sistema de detección de fluorescencia (fluorímetro), basándose en la utilización de unas moléculas específicas denominadas fluoróforos y quenchers. Ambos factores, nos va a permitir monitorizar, en tiempo real, lo que está ocurriendo dentro de cada tubo en cada ciclo de amplificación y va a sustituir a los pasos de, electroforesis y análisis de imagen de una PCR tradicional. (**Figura 27**)



**Figura 27** Curva de incremento de la fluorescencia con respecto a cada ciclo de amplificación. Tomada de [www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf)

El parámetro fundamental en una PCR en Tiempo Real y en función del cual se van a realizar todos los cálculos analíticos y obtención de resultados, es el denominado **Ciclo Umbral (Threshold Cycle o Ct)**, que se define como el ciclo a partir del cual la fluorescencia es estadísticamente significativa por encima del ruido de fondo (background)(Figura 28)



**Figura 28** Donde se puede observar el ciclo umbral o Ct de cada una de las muestras problema. Tomada de [www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf)



Las principales propiedades de este parámetro Ct son:

- ❖ Separa los datos del ruido de fondo.
- ❖ Determina el ciclo inicial de amplificación.
- ❖ Es inversamente proporcional al número de copias inicial del template
- ❖ Se suele establecer como 10 veces el ruido de fondo, aunque se puede modificar manualmente.

Dentro de los fluoróforos se determinan dos tipos de mecanismos de detección:

**No específicos.** Detectan todos los DNA de doble cadena (dsDNA) producidos durante la reacción de amplificación (ya sea producto específico, producto inespecífico o dímeros de primers). Es el método estándar y consiste en añadir un agente intercalante de la doble cadena o un fluoróforo que emite fluorescencia cuando se une a ésta. (**Figura 29**) El más utilizado es el SYBR Green I que se excita a 497nm y emite a 520nm.

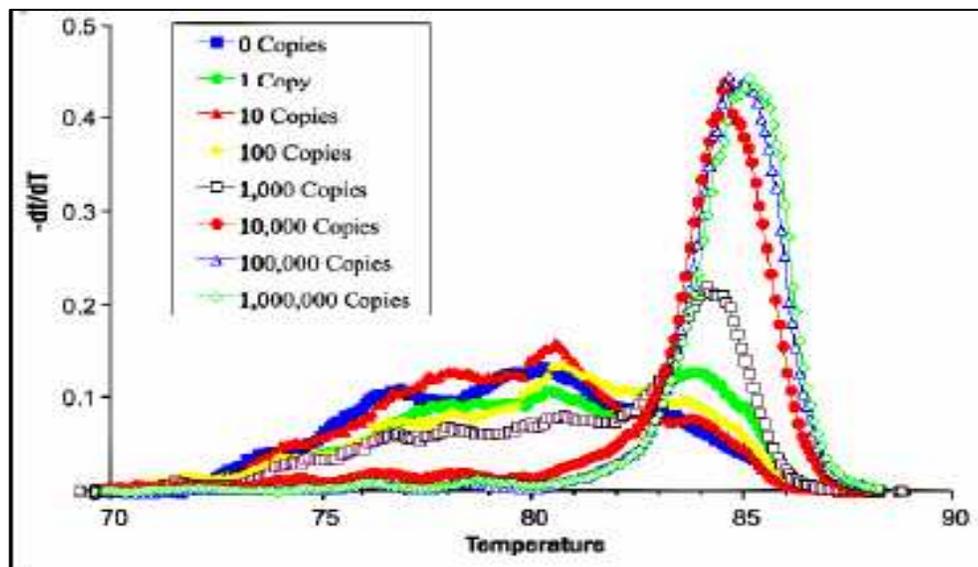


**Figura 29** Se muestra como actúa el fluoróforo Sybr-green intercalándose a la doble cadena DNA.  
Tomada de [www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf)



Para discriminar si las muestras con curva de amplificación positivas corresponden a productos específicos o a dímeros de primers o productos inespecíficos, se realiza una curva de desnaturalización (“melting curve”) al final de la reacción: (**Figura 30**) La reacción se calienta lentamente desde 50°C hasta 95°C monitorizando continuamente la fluorescencia; la temperatura a la cual el DNA se desnaturaliza se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green I.

Los productos de PCR de diferente longitud y diferentes secuencias se desnaturalizan a diferentes temperaturas, observándose diferentes picos cuando se representa la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura  $\left(-\frac{dF}{dT}\right)$  frente a la temperatura.

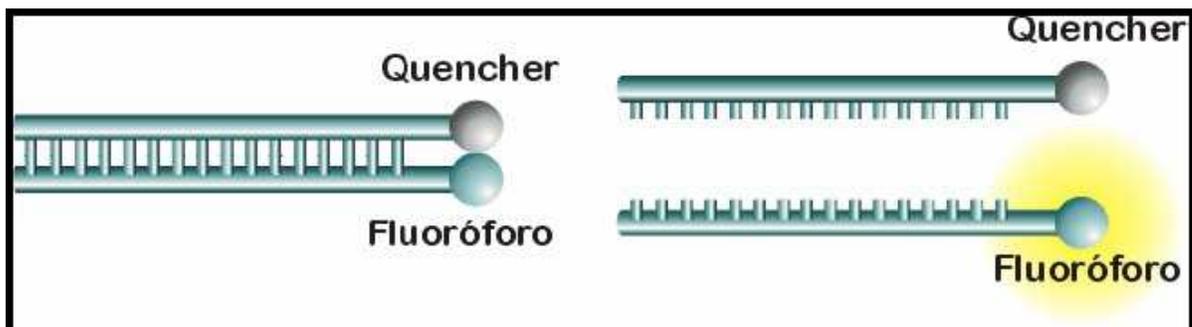


**Figura 30** Donde se muestra la Temperatura de meeting (T<sub>m</sub>) específica del producto que es el pico más alto. Tomada de [www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf)

Una posibilidad para evitar este problema es desnaturalizar los productos de PCR incrementando la temperatura de la muestra. A la temperatura de melting ( $T_m$ ) del producto, se puede observar una drástica reducción de la intensidad de fluorescencia, ya que los productos de PCR inespecíficos (cortos) se desnaturalizan a una temperatura muy inferior que los específicos (largos). Esto permite corregir las curvas de desnaturalización de la contribución de los productos de PCR inespecíficos, incrementando la sensibilidad de la técnica a una copia por reacción.

**Específicos.** Estos sistemas de detección son capaces de distinguir entre la secuencia de interés y los dímeros de primers o las amplificaciones inespecíficas. Todos ellos se basan en la utilización de quenchers y sondas marcadas con un amplio rango de fluoróforos con diferentes espectros de excitación y emisión. **(Figura 31)**

Un fluoróforo es una molécula que absorbe energía y pasa a un estado excitado; posteriormente, al volver al estado inicial emite el exceso de energía en forma de fluorescencia. Los quenchers son moléculas que aceptan la energía de un fluoróforo y la disipan en forma de calor o fluorescencia. <sup>(40)</sup>



**Figura 31** Mecanismo de acción de un Quencher. Tomada de [www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf)



## **11 TRATAMINETO.**

- Crioterapia
- Electrocirugía
- Láser
- Intervención quirúrgica
- Radioterapia y quimioterapia

Los métodos empleados para tratar las lesiones intraepiteliales escamosas incluyen a la cauterización en frío (congelación que destruye tejidos), el tratamiento con rayo láser (cirugía realizada con una luz de alta intensidad), la extirpación electroquirúrgica a fin de eliminar un tejido mediante una asa de alambre caliente (LEEP), así como la intervención quirúrgica ordinaria.

El tratamiento de las lesiones causadas por VPH depende de la severidad y extensión de la misma. Las lesiones de bajo grado pequeñas son tratadas con crioterapia, mediante esta técnica las células infectadas son destruidas por congelamiento. Se cree que la crioterapia puede producir inmunodepresión a nivel local, lo cual podría influir en que la defensa inmune natural del área cervical se viera reducida y, por tanto, expuesta a nuevas infecciones de índole diversa.

Cuando las lesiones son extensas, deben ser tratadas con electrocirugía, esta terapia involucra el uso de un asa diatérmica. El éxito del tratamiento es muy alto, el tejido cicatriza eficazmente y, al ser una técnica ablativa conservadora, no se compromete la capacidad reproductiva de la paciente tratada.

Las lesiones más extensas requieren de un tratamiento mas agresivo, para ellas se utiliza la terapia con rayo láser. En esta técnica se emplean aditamentos especialmente diseñados para generar una emisión láser con una capacidad de penetración que solo elimine las células potencialmente infectables por el VPH, sin dañar tejidos vecinos.



Las lesiones cervicales de alto grado deben ser eliminadas por métodos quirúrgicos más agresivos, como el cono cervical. Sin embargo esto no es aplicable cuando se detecta un cáncer invasor, en este caso la histerectomía (parcial o total dependiendo de las características de la paciente y de su tumor) es la alternativa quirúrgica empleada. Los cánceres avanzados, en los cuales la cirugía ya no es aplicable, son tratados con radioterapia y/o quimioterapia.

Otros tratamientos menos comunes incluyen los medicamentos 5-FU (5-fluorouracil) e Interferón-alfa. La crema *Imiquimod* también ha sido aceptada recientemente por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) El Imiquimod trabaja estimulando el sistema inmune para luchar contra el virus <sup>(41, 42)</sup>

A partir de este año se está comercializando la vacuna recombinante tetravalente **Gardasil** contra el VPH (tipos 6, 11, 16, 18), la vacunación está indicada para proteger frente a enfermedades causadas por estos tipos virales que incluyen cáncer de cuello de útero, lesiones pre-cancerosas de áreas genitales femeninas (cuello de útero y vulva) y verrugas genitales. Es un preparado estéril para administración intramuscular, suspensión líquida estéril preparada a partir de las partículas parecidas a virus VPH altamente purificadas, compuestas de la proteína recombinante de la cápside mayor (proteína L1) del VPH de los tipos 6, 11, 16 y 18. Las proteínas L1 se producen mediante fermentaciones por separado en levadura recombinante *Saccharomyces cerevisiae* CANADE 3C-5 (cepa 1895) y se autoensamblan para formar las partículas parecidas a virus. Las partículas parecidas a virus de cada tipo se purifican y se adsorben en el adyuvante de aluminio (sulfato hidroxifosfato de aluminio amorfo).

Resultados preliminares sugieren que la vacunación con Gardasil podría prevenir incluso la infección por los tipos 31 y 45. Está indicada para la inmunización de niños y adolescentes de entre 9 y 15 años y a mujeres adultas de entre 16 y 26 años. La inmunización se realiza en tres dosis, la primera en la fecha elegida, segunda 2 meses después de la primera y la tercera 6 meses después de la primera <sup>(43)</sup>



## **II. JUSTIFICACIÓN**

A pesar de los esfuerzos realizados en la prevención, el diagnóstico precoz y las mejoras en el tratamiento de las lesiones precursoras, el cáncer cervicouterino es el de mayor incidencia en la población femenina siendo un importante problema de salud y causa de muerte en México. Se ha calculado que 16 mujeres mueren diariamente por cáncer cervical. Tan solo en 2002 con una tasa de incidencia de 29.5 por 100,000 habitantes y una tasa de mortalidad 8.6 por 100,000 mujeres, registrándose anualmente más de 4,000 muertes; lo que demuestra que el programa de detección oportuna de cáncer cervicouterino ha tenido un impacto pobre en la disminución de la frecuencia.

El interés en el desarrollo y uso de una metodología molecular es por su sensibilidad y especificidad para la detección temprana y genotipificación del virus en lesiones pre-malignas, y así ayudar a disminuir la incidencia del cáncer cervicouterino y el porcentaje de falsos negativos que presenta el estudio citológico en la población en nuestro país, a fin de brindar un tratamiento y seguimiento adecuado antes de la evolución al cáncer.

Al ser pocos los estudios en México sobre tipificación y prevalencia de los tipos del VPH, que éste se utilice para conocer las tipos más frecuentes en la población mexicana y saber si existe una relación entre el tipo viral encontrado y la clasificación de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) para proporcionar una herramienta útil como primera instancia al solo tener un estudio histológico.



### **III. HIPÓTESIS**

#### **Hipótesis Alterna**

Los tipos virales del VPH se clasifican en alto y bajo riesgo por lo que es posible encontrar una relación entre los distintos grados neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y el tipo viral del VPH

#### **Hipótesis Nula**

No hay relación aparente entre los distintos grados neoplasias intraepiteliales cervicales (NIC) y el tipo viral del VPH.



## **IV. OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar el genotipo del Virus del Papiloma Humano en muestras de tejido cervical parafinado con diagnóstico histopatológico, por PCR múltiple y específico utilizando las regiones de E6 y E7

### **Objetivo Especifico**

- Establecer condiciones adecuadas para la extracción de DNA a partir de tejido parafinado.
- Detección de la presencia del VPH en diferentes muestras de tejido cervical diagnosticadas como NIC I, NIC II; NIC III y carcinomas.
- Determinar el genotipo de VPH por PCR usando las regiones de E6 y E7.
- Relacionar el tipo viral con las neoplasias NIC I, NIC II, NIC III y carcinomas.



## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.**

#### **5.1.1 Muestra poblacional.**

**5.1.1.1 Selección de la muestra.** La muestra de esta investigación está conformada por 143 muestras de tejido con inclusión en parafina de cérvix proveniente de biopsias y conos.

**5.1.1.2 Criterios para la selección de la muestra.-** Presencia de alteraciones celulares que revelaran la probable presencia de infección por VPH y que comprendieron coilocitosis y distintos grados de neoplasia intrapitelial de cérvix (NIC) y cáncer.

**5.1.2 Fuente de casos.-** Los cortes histológicos de este estudio, provinieron del Departamento de Cito-Histopatología perteneciente al Laboratorio de Referencia Internacional CARPERMOR. En el **anexo I** se presenta un tabla de la muestras utilizadas con la clave del departamento de Cito-histopatología, el diagnostico obtenido por el mismo y el resultado de detección de VPH por PCR del Dpto. de Biología Molecular.



## **5.2 REACTIVOS.**

**5.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).** Los reactivos usados para la PCR fueron: Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ l), buffer (10x),  $MgCl_2$  (50 mM), dNTP (12.5 mM) .(Invitrogen, Brasil) e iniciadores específicos

### **5.2.2. Iniciadores.**

**5.2.2.1. Detección de VPH.** Se utilizaron los iniciadores LIC1, LIC2 y L1C2M (satoshi Kado, 2001) pertenecientes a la región L1 del VPH. LIC1 5' sentido CGT AAA CGT TTT CCC TAT TTT TTT; LIC2 TAC CCT AAA TAC TCT GTA TTG y LIC2M TAC CCT AAA TAC CCT ATA TTG (Invitrogen, Brasil)

**5.2.2.2 Genotipificación del VPH.** Se utilizaron iniciadores específicos para cada tipo viral, pertenecientes a las regiones E6 y E7. En el **anexo II** se muestra la secuencia de las regiones E6 y E7, así como los iniciadores de cada tipo viral estudiado.

**5.2.3. Electroforesis.** Agarosa grado electroforesis (2.0 gr/100 ml), marcador comercial de peso molecular de 123 pb y 10 pb (Invitrogen, Brasil), buffer de boratos TBE 10X (Tris-Borato-EDTA) (), bromuro de etidio 10 mg/ml.

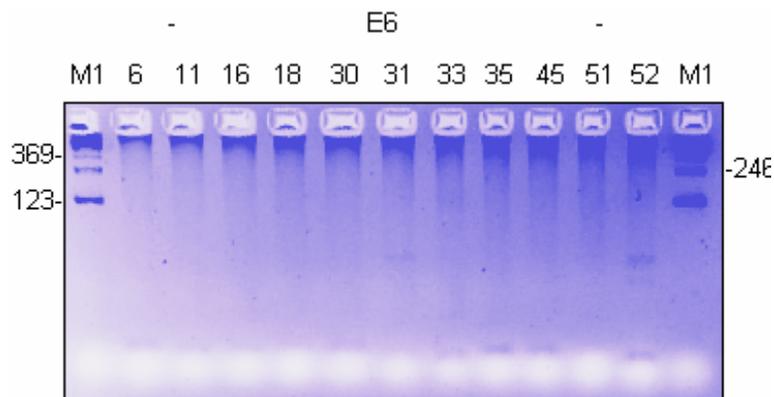
**5.2.4. Equipo.** Termociclador tiempo real (Rotor Gene 3000), Termociclador Palm-cycler (Biolab), Transiluminador UV (Hoefler Macro Vue uvis-20); Cámara electroforética (Bio-rad). Campana de seguridad biológica (Nuaire Clase II tipo A), Microcentrífuga refrigerada (Jouan MR22)

### 5.3 CONTROLES.

#### 5.3.1. Controles en el proceso de extracción

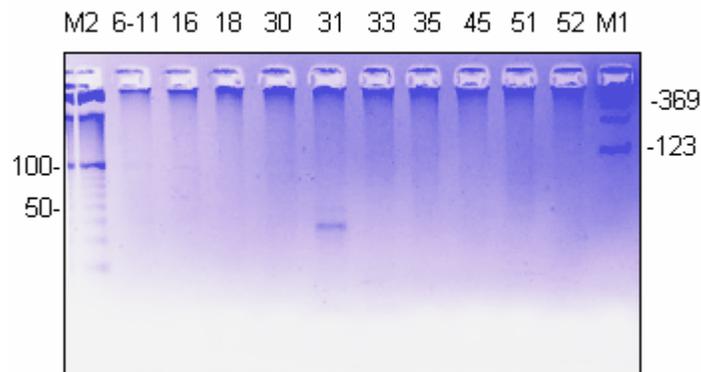
**5.3.1.1. Controles Negativos.-** Se utilizaron muestras de tejido cervical (cortes histológicos) negativas o sin alteración celular que sugiriera la posible infección por VPH, muestras de raspado endocervical negativas a VPH por CH2.; estos se obtuvieron de Laboratorio de Referencia Internacional. CARPERMOR. En las siguientes figuras se muestra los corrimientos electroforeticos de los controles que se utilizaron. (**Figuras A-D**)

#### AMPLIFICACIÓN DE E6 POR PCR ESPECÍFICO DEL CONTROL NEGATIVO DE TEJIDO



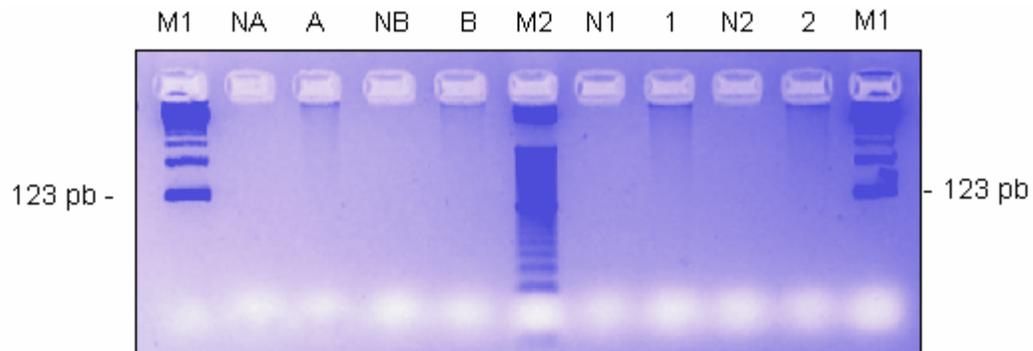
**Figura.-A** Amplificación como control negativo de una muestra de tejido con par de iniciadores específicos de cada tipo viral. Donde el pozo marcado como **M1** es marcador de peso molecular de **123pb**; en los pozos siguientes los tipos virales correspondientes a la región **E6**. No se observa ningún amplificado.

**AMPLIFICACIÓN DE E7 POR PCR ESPECÍFICO  
DEL CONTROL NEGATIVO DE TEJIDO**



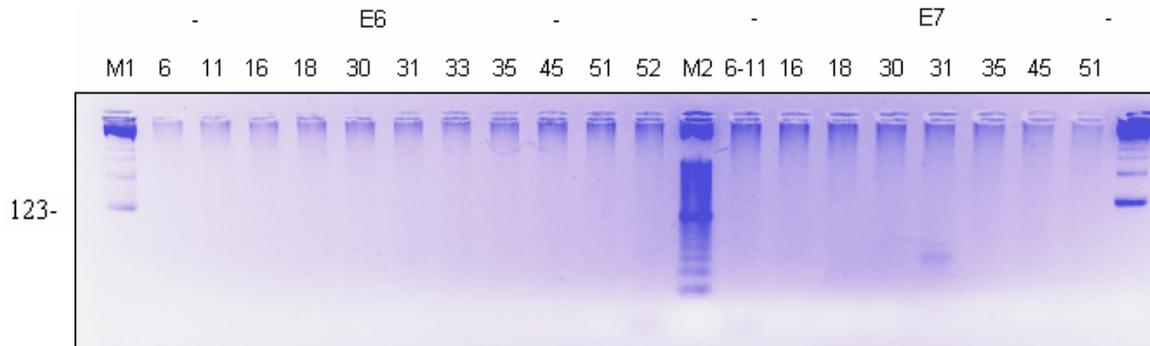
**Figura -B** Amplificación como control negativo de una muestra de tejido con par de iniciadores específicos de cada tipo viral. Donde el pozo marcado como **M1** es marcador de peso molecular de **123pb**; **M2** es marcador **10 pb**, en los pozos siguientes los tipos virales correspondientes a la región **E7**. En el tipo viral **31** se observa una banda de 30pb que es inespecífica ya que no corresponde al tamaño esperado; en los otros tipos virales no se visualiza ningún amplificado.

**AMPLIFICACION POR PCR MULTIPLEX DEL CONTROL NEGATIVO DE CH**



**Figura.-C** Amplificación por PCR Multiplex en grupos del control negativo de una muestra de Raspado Endocervical proveniente de la prueba por Captura de Híbridos. Donde **M1** es marcador de peso molecular de **123 pb**; **M2** marcador de **10 pb**; **N** corresponde a control negativo de agua de cada grupo, **A** corresponden a la amplificación del grupo A (Región E6 para los tipos virales 6, 11, 30, 31, 35, 45 y 51), **B** corresponde a la amplificación del grupo B (Región E6 de los tipos virales 16, 18, 33 y 52), el pozo **1** corresponde a la amplificación del grupo 1 (Región E7 de los tipos virales 6, 11, 18, 30, 35, y 51), y finalmente el pozo **2** corresponde al grupo 2 (Región E7 de los tipos virales 16, 31, 33, 45 y 52). El resultado, no se observa ningún amplificado.

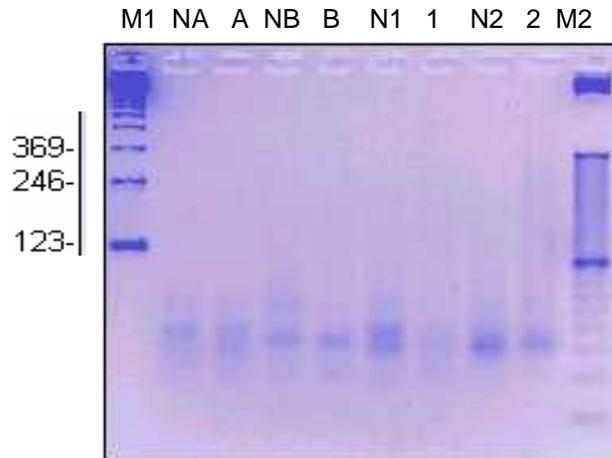
### AMPLIFICACIÓN POR PCR ESPECÍFICA DEL CONTROL NEGATIVO DE CH2



**Fig. D** Amplificación con par de iniciadores específicos de cada tipo viral del control negativo de una muestra de Raspado Endocervical proveniente de la prueba por Captura de Híbridos. Donde M1 es marcador de peso molecular de 123pb; M2 es marcador de peso molecular de 10 pb. En los pozos los tipos virales correspondientes a la región E6 y E7  
No se observa ningún amplificado.

Así mismo se procesaron 4 muestras con agua, esterilizada y libre de RNA'asas tal como si fueran una muestra desde el proceso de extracción hasta la detección en el gel y estuvieron distribuidos en los procesos de extracción que se llevaron a cabo para verificar el funcionamiento de los iniciadores diseñados y la posible contaminación de muestras. El resultado de la amplificación múltiple de los 4 controles de agua se resume en la (**Figura. E**), y por lo tanto no fue necesario realizar una PCR específica como cualquiera de las otras muestras.

**AMPLIFICACION POR PCR MULTIPLEX DEL  
CONTROLNEGATIVO DE AGUA**



**Figura.-E** Amplificación por PCR Multiplex en grupos del control de agua en la que no se muestran amplificados. Donde **M1** es marcador de peso molecular de **123 pb**; **M2** marcador de **10 pb**; **N** corresponde a control negativo de agua de cada grupo; **A** corresponde a la amplificación del grupo A (Región E6 para los tipos virales 6, 11, 30, 31, 35, 45 y 51) **B** corresponde a la amplificación del grupo B (Región E6 de los tipos virales 16, 18, 33 y 52) **1** corresponde a la amplificación del grupo 1 (Región E7 de los tipos virales 6, 11, 18, 30, 35, y 51) finalmente el pozo **2** corresponde al grupo 2 (Región E7 de los tipos virales 16, 31, 33, 45 y 52) El resultado negativo a la amplificación de los otros 3 tubos controles con agua



### **5.3.2 Controles en el proceso de amplificación.**

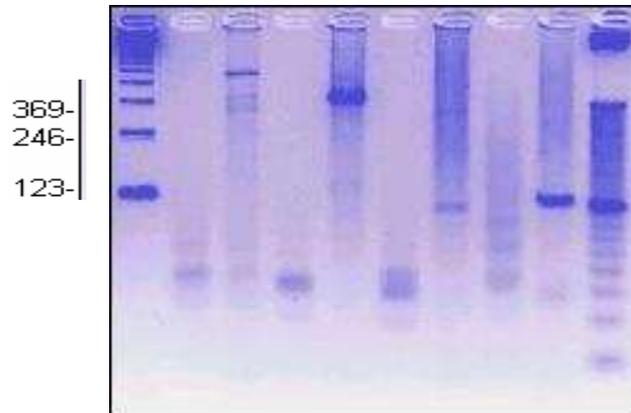
**5.3.2.1 Controles Negativos:** Se realizó la amplificación de las regiones E6 y E7 para cada muestra con su respectivo control negativo que se compone de la mezcla maestra más agua.

**5.3.2.2 Controles Positivos:** Se realizó la amplificación del DNA del VPH tipo 16 (Línea celular Caski) y 18 (Línea celular INBL). La extracción de DNA de estos controles fue proporcionada por el Hospital Centro Medico Siglo XXI. No fue posible conseguir controles para otros tipos virales y es importante recordar que los virus del grupo de bajo riesgo no se integran y por tanto no existe un control para corroborar.

**5.3.2.3 Control positivo del tipo viral 16** Se realizó una amplificación por PCR múltiple para observar si existía una reacción cruzada entre los iniciadores y por tanto amplificación inespecífica además de demostrar la funcionalidad de los mismos. Para el control positivo del tipo viral 16 se obtienen las bandas de los amplificadores muy intensas en los grupos esperados, de acuerdo con la separación de grupos, y al parecer en concordancia con el tamaño del fragmento esperado para la región E6 y E7 (**Figura F**), pero también se obtienen amplicones inespecíficos de tamaño similar en los otros 2 grupos.

### AMPLIFICACIÓN POR PCR MULTIPLEX DEL CONTROL POSITIVO DEL TIPO VIRAL 16

M1 NA A NB B N1 1 N2 2 M2



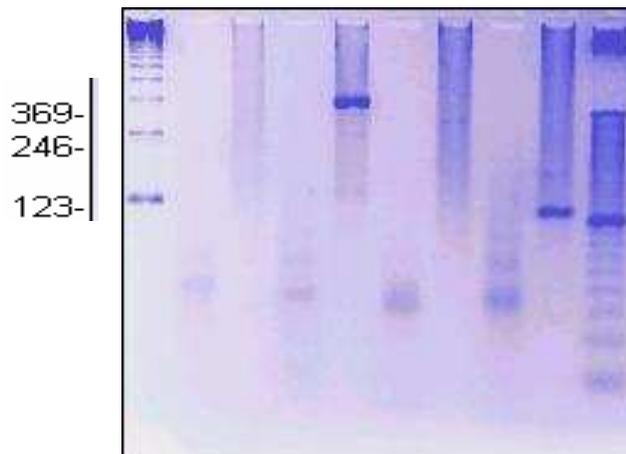
M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo  
A = Grupo (A) E6: 6,11,30,31,35,45,51  
B = Grupo (B) E6: 16,18,33,52  
1 = Grupo (1) E7: 6,11,35,18,51,30  
2 = Grupo (2) E7: 31,33,45,52,16

**Figura.-F** Amplificación por PCR multiplex en grupos del control del tipo viral 16, línea celular Caski, en la que se pueden observar las bandas esperadas dentro del grupo correspondiente y amplicones inespecíficos en los otros grupos.

**5.3.2.4 Control positivo del tipo viral 18** En el caso del control positivo para el tipo viral 18, línea celular INBL, se observa que en la amplificación múltiplex por grupo se obtiene el fragmento esperado de la Región E6 en el grupo correspondiente y del tamaño aproximado al calculado sin obtener otros amplificadas similares o que puedan interferir en el otro grupo asignado para la Región E6; pero no así para la región E7, en la que el amplificado se presenta en el grupo no esperado confundiendo el resultado con el del tipo viral 16 (**Figura G**) y la amplificación inespecífica es poco intensa.

**AMPLIFICACIÓN POR PCR MULTIPLEX DEL CONTROL POSITIVO DEL TIPO VIRAL 18**

M1 NA A NB B N1 1 N2 2 M2



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo  
A = Grupo (A) E6: 6,11,30,31,35,45,51  
B = Grupo (B) E6: 16,18,33,52  
1 = Grupo (1) E7: 6,11,35,18,51,30  
2 = Grupo (2) E7: 31,33,45,52,16

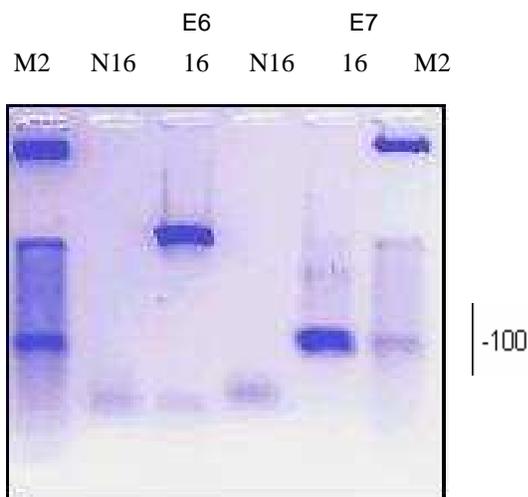
**Figura.-G.** Amplificación por PCR multiplex organizada en grupos del Control Positivo para el tipo viral 18 (INBL) que muestra el amplificado esperado para la Región E6 y no así para E7.



En ambos controles se realizó la amplificación específica, con los iniciadores diseñados para el tipo viral 16 y 18 de acuerdo con lo observado en la PCR múltiplex y con el conocimiento del tipo viral que se encontraba en cada extracción. En el caso del Control Positivo del tipo 16 solo se realizó la amplificación con los cebadores para este tipo, los resultados se muestran en la **(Figura H)** concordando con lo esperado además de amplicones inespecíficos.

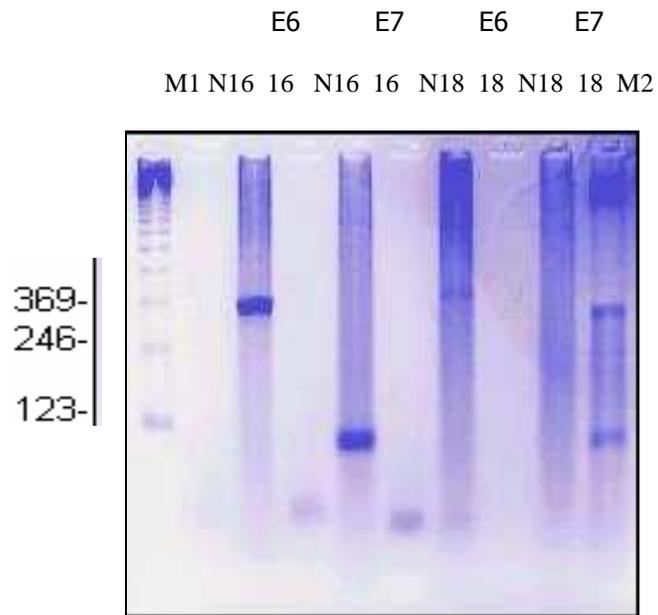
En el caso del Control Positivo para el tipo viral 18 se encontró que mediante la PCR múltiplex se confundía el genotipo con el tipo viral 16 debido a la presencia de un amplificado el grupo no correspondiente, por lo que fue necesario amplificar este control con los iniciadores del tipo viral 16 y 18 para las regiones E6 y E7 encontrando los resultados que se muestran en la **(Figura I)**

**AMPLIFICACIÓN DE E6 Y E7 POR PCR ESPECÍFICA DEL CONTROL POSITIVO DEL TIPO VIRAL 16**



**Figura-H** Amplificación específica del Control Positivo para el tipo viral 16 con los cebadores del tipo viral correspondiente; los pozos marcados como **M2** corresponden al marcador de **10** pb, los pocillos marcados como **16** y **N16** corresponden al tipo viral 16 más su control negativo de amplificación. La región E6 y E7 esta especificada como subíndice.

**AMPLIFICACIÓN DE E6 Y E7 POR PCR ESPECÍFICA DEL CONTROL POSITIVO DEL TIPO VIRAL 18**



**Figura.-I** Amplificación específica con los iniciadores específicos para el tipo viral 16 y 18 de cada región para el Control Positivo del tipo viral 18. Donde **M1** corresponde marcador peso molecular de **123** pb y **M2** al de **10** pb; la amplificación para el tipo viral 16 con su respectivo control negativo está señalado como **N16** y **16** y los subíndices indican a que región hace referencia, mientras que la amplificación para el tipo viral 18 más su control negativo corresponde a los pozos **N18** y **18**; los respectivos subíndices correspondientes a cada región. En esta figura se resuelve que el control positivo para el tipo viral 18 amplifica con los cebadores del tipo viral 16 y que los iniciadores para el tipo viral 18 región E6 amplifican pobremente con la muestra y no se alinean a la muestra en la Región E7.



## **5.4 MÉTODOS**

**5.4.1. Preparación de la muestra.** Cortes histológicos de 10 micras con 2 ó más tejidos por laminilla

### **5.4.1.1 Desparafinación y rehidratación de cortes histológicos.**

1. Se desparafinaron las laminillas durante 30 min. en una estufa a 60 grados
2. Sin dejar enfriar los tejidos se colocaron en xilol durante 5 min.
3. Se pasaron a otro cambio de xilol y se dieron 15 baños.
4. Después a una cuba con alcohol absoluto y 15 baños.
5. Otra con alcohol absoluto y 15 baños.
6. Se colocaron las laminillas en alcohol del 96 y se dieron 15 baños
7. Se pasaron a alcohol al 70% y 15 baños.
8. Se colocaron en una cuba con alcohol al 50% y se dieron 15 baños.
9. Se dejaron en agua deionizada.
10. Se traspaso el tejido desparafinado de la laminilla a un tubo eppendor estéril de 2 ml con ayuda de una hoja de cutter.

Nota: para evitar contaminación cruzada al realizar los cortes, el micrótopo se limpio entre cada corte, así como la hoja de cutter se esterilizo con alcohol absoluto y calor en el traspaso del tejido.

**5.4.2 Extracción de DNA.** Se realizó la extracción de ácidos nucleicos de 143 cortes histológicos mediante el método de extracción en columna de silica gel QIAamp UltraSens Viral (QIAGEN). Este método es para extracción de ácidos nucleicos de HIV HCV a partir de muestras de plasma y se acoplo para la extracción de ácidos nucleicos en muestras de tejido cervical. Las muestras fueron procesadas dentro de la campana de seguridad biológica NUAIRE Clase II tipo A.



1. Se realizó una previa digestión con 20  $\mu$ l de proteinasa K (20mg/ml) durante 24 hrs a 55° C en un baño seco (vortexear de vez en cuando) el tejido deberá estar disgregado.
2. Se adiciono 800  $\mu$ l de Buffer AC (no homogenizar).
3. Se colocó 5.6  $\mu$ l de solución acarreador de RNA.
4. Se mezcló por inversión 3 veces y en vortex por 10 seg.
5. Se incubó 10 min. a temperatura ambiente.
6. Se centrifugó a 1600x g por 3 min. en la microcentrífuga refrigerada Jouan MR22 (el sobrenadante debe verse claro).
7. Se removió y desechó el sobrenadante con ayuda de una pipeta con punta capilar. Y se resuspende el pellet o pastilla
8. Se adiciono 300  $\mu$ l de buffer AR precalentado a 60°C y 20  $\mu$ l de proteinasa K(20 mg/ml). Se mezcló en vortex hasta resuspender la pastilla.
9. Se incubó 10 min. a 40°C, (vortexear de 5-10 seg. antes, durante y después de la incubación).
10. Se centrifugó brevemente para remover gotas en boca del tubo.
11. Se adiciono 300  $\mu$ l buffer AB se mezcló y centrifugó brevemente a 1400 x g.
12. Se adiciono 700  $\mu$ l de la mezcla a la columna de separación.
13. Se centrifugó 4500 x g por 1 min. Desacatar el sobrenadante.
14. Se adiciono 500  $\mu$ l de buffer AW1.
15. Se centrifugó a 6000x g por 1 min. Desechar sobrenadante.
16. Se adiciono 500  $\mu$ l de buffer AW2 .
17. Se centrifugó 20000x g por 3 min.
18. Se colocó la columna a micro tubo eppendor de 2 ml limpio.
19. Se eluye con 30  $\mu$ l de buffer AVE directamente a la columna.
20. Se centrifugó a 6000x g 1 min.
21. Se repite la elución añadiendo 30  $\mu$ l de buffer AVE y centrifugando a 6000x g 1 min.



**5.4.3 Amplificación de VPH (L1) por PCR.** La amplificación se realizó con los iniciadores LIC1, LIC2 y L1C2M (Satoshi Kado, 2001) pertenecientes a la región L1 del VPH. Se escogió esta región por ser la más conservada en todos los tipos virales. La metodología empleada fue por PCR tiempo real en el termociclador Rotor-Gene 3000. Los componentes y cantidades de la mezcla maestra para la amplificación de la región L1 las cuales se dan a continuación en la (**Tabla 6**) y las condiciones de amplificación en la (**Tabla 7**)

**Tabla 6.** Componentes de la mezcla maestra

Mezcla Maestra	Cantidad (para 1 reacción 25uL)
Taq DNA pol (5U/uL)	0.125 $\mu$ l
dNTP's 10 mM	0.5 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.75 $\mu$ l
Iniciador L1C1	0.50 $\mu$ l
Iniciador L1C2	0.50 $\mu$ l
Iniciador L1C2M	0.50 $\mu$ l
Buffer 10X	2.50 $\mu$ l
Agua	14.125 $\mu$ l
Sybrgreen 10X	0.50 $\mu$ l
DNA	5.0 $\mu$ l



Tabla 7. Condiciones de amplificación de la región L1	
Desnaturalización:	95°C 2 min.
40 ciclos de:	
Desnaturalización:	95°C 20s
Alineamiento:	48°C 20s
Extensión:	72°C 20s
Lectura:	83°C 20s

**5.4.4 Amplificación del control interno  $\beta$ -actina.** La función de amplificar este fragmento del gen humano beta-actina es de control interno; para corroborar que la extracción se realizó adecuadamente, la integridad del DNA y la ausencia de inhibidores en la PCR o extracción.

La amplificación se realizó con el kit Lux de Invitrogen, que contiene uno de los primers marcados con JOE o FAM., por PCR en tiempo real en el termociclador Rotor-Gene 3000. Los componentes de la mezcla maestra se encuentran en la (Tabla 8) y las condiciones de amplificación (Tabla 9) del gen  $\beta$ - actina.

**Tabla 8.** Condiciones de Amplificación de  $\beta$ -actina.

Mezcla Maestra	
SuperMix-UDG 2X	12.5 uL
Primer R	1.0uL
Primer F	1.0 uL
H2O	5.5uL

**Mezcla Maestra (1 reacción 25 uL)**



Tabla 9. Condiciones de amplificación de $\beta$ -actina.		
Desnaturalización:	95°C	2 min
40 ciclos de:		
Desnaturalización:	95°C	15s
Alineamiento:	55°C	30s
Extensión:	72°C	30s
Lectura:	55°C	30s

**5.4.5 Detección del VPH y Control Interno  $\beta$ - actina.** Se realizo de 2 formas por electroforesis y por monitoreo de la amplificación por gráficas del termociclador en tiempo real.

**5.4.5.1. Electroforesis en gel de Agarosa** Una vez realizada la amplificación, las bandas se identificaron en gel de agarosa al 2% en TBE 0.5x , a 85 volts por 45 min, visualizados con bromuro de etidio. Las muestras (10  $\mu$ l amplificado) fueron cargadas con buffer de carga Blue juice (2  $\mu$ l), se colocó un marcador de peso molecular (123 pares de bases), para identificar el tamaño del amplicon. El fragmento esperado, es de 246 pb (VPH Región L1), y 123 pb ( $\beta$ - actina); se visualiza en un transiluminador de luz UV. Se estableció como No Detectado ó amplificación negativa para VPH cuando la banda de tamaño esperado estuvo ausente con presencia de la banda del control interno.

**5.4.5.2 Graficas de cuantificación y melting en tiempo real** Las graficas de tiempo real son útiles para visualizar si la muestra es detectada o no al VPH; ya que nos da el seguimiento de la amplificación en cada ciclo de la PCR a través de la señal quimioluminiscente de un marcador fluorescente que en nuestro estudio se utilizó Sybr-green, éste emite fluorescencia al introducirse donde encuentra doble

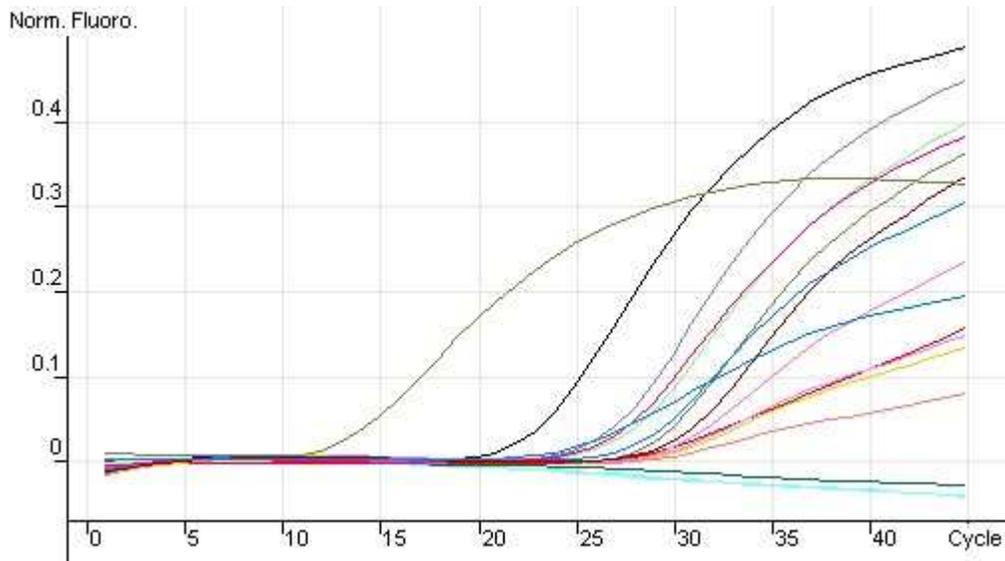


cadena de DNA. Para el caso de B-actina se utilizaron los flouoroforos FAM o JOE. (Invitrogene).

Para la especificidad del producto amplificado se utiliza el melting que es la temperatura a la cual se desnaturaliza el amplificado y esta es específica para cada amplicon. A continuación en las (**Gráficas 1 4**), se muestran ejemplos de graficas en tiempo real correspondientes a VPH y Beta-actina respectivamente.

### **Gráfica 1.** PCR en tiempo real para la amplificación L1 del VPH

#### **Información sobre la cuantificación VPH en cada ciclo con Sybr-green**

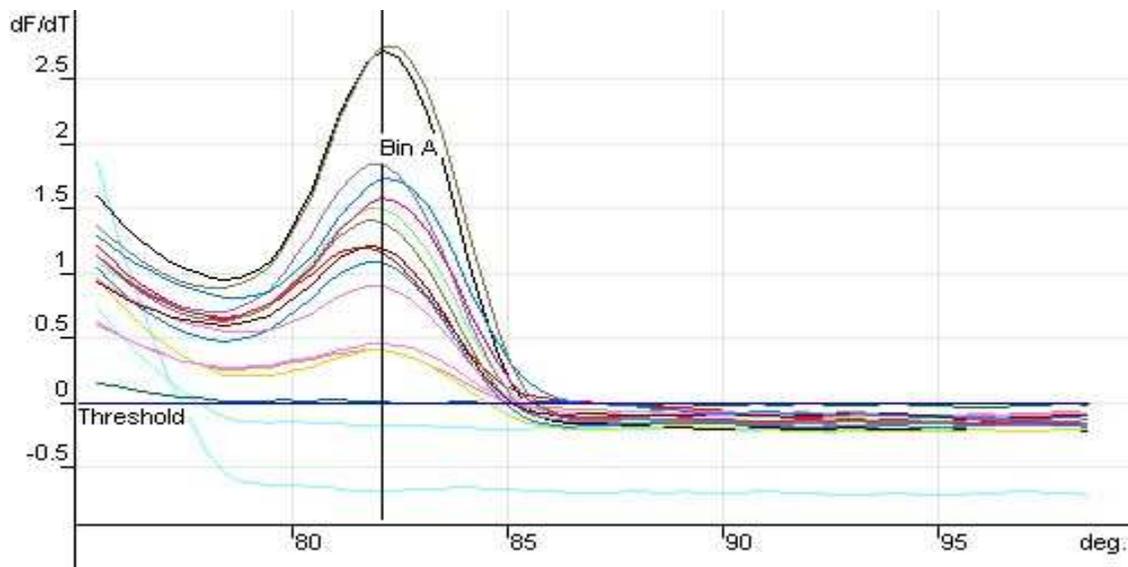


Este reporte fue generado por el instrumento rotor Gene en Tiempo real Corbett Research 2004 con el software de análisis 6.0



**Gráfica 2.- PCR en tiempo real para la amplificación L1 del VPH**

**Información de la curva de desnaturalización del amplicon con SYBR Green**



**Tabla 10.** Temperatura de desnaturalización del producto

No.	Código de Muestra	Tm específica del amplicon
1	CN	
2	CN	
3	CP	81.7 (Bin A)
4	436	82.2 (Bin A)
5	5455	
6	188	81.8 (Bin A)
7	3012	82 (Bin A)
8	4033	82 (Bin A)
9	4711	82 (Bin A)
10	570	82 (Bin A)
11	976	82 (Bin A)
12	5739	82.2 (Bin A)
13	09	82 (Bin A)

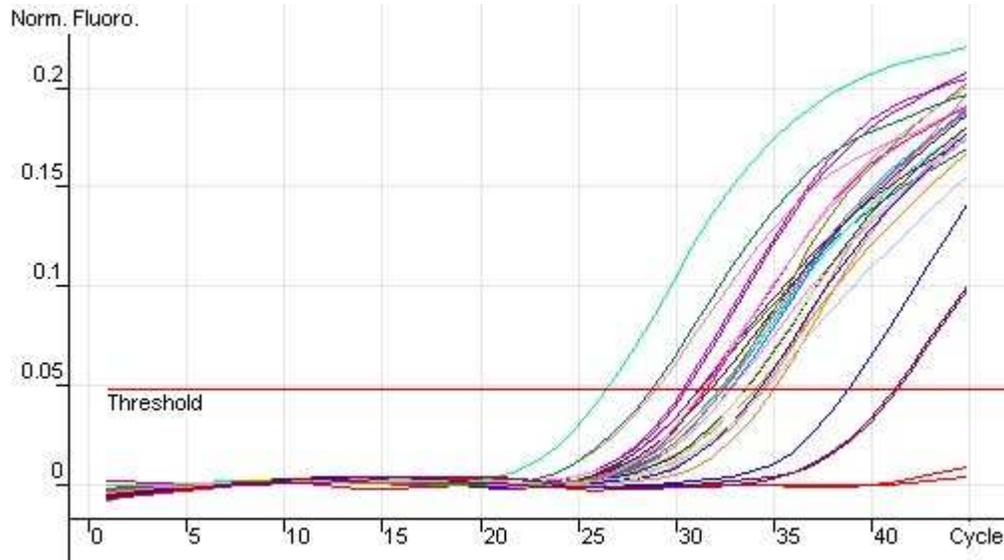


No.	Código de Muestra	Tm específica del amplicon
14	340	82.2 (Bin A)
15	48	82 (Bin A)
16	721	82.3 (Bin A)
17	6023	82.3 (Bin A)

En la (Tabla 10) se observan las muestras que son positivas a la detección de VPH por la amplificación de la región L1, ya que todas aquellas que muestran la misma temperatura de desnaturalización o no mayor a 3 grados son detectadas.

**Gráfica 3.-** PCR en tiempo real para amplificación  $\beta$ -actina.

**Información sobre la cuantificación  $\beta$ -actina en cada ciclo con FAM**

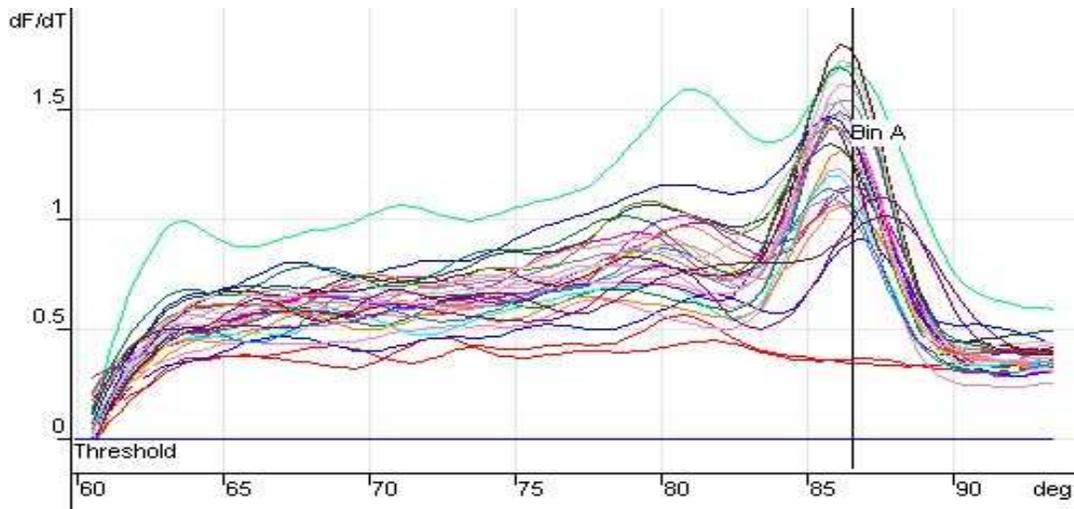


Este reporte fue generado por el instrumento rotor Gene en Tiempo real Corbett Research 2004 con el software de análisis 6.0



**Gráfica 4.-** PCR en tiempo real para amplificación  $\beta$ -actina.

**Información de la curva de desnaturalización del amplicon con FAM**



Este reporte fue generado por el instrumento rotor Gene en Tiempo real Corbett Research 2004 con el software de análisis 6.0

**5.4.6 Genotipo VPH (E6 y E7)** Las muestras positivas a la detección de VPH por la amplificación de L1, se les realizó la genotipificación, amplificando las regiones E6 y E7 del virus por ser estas las proteínas relacionadas con la carcinogénesis. Para seleccionar los tipos virales se baso en los más frecuentes encontrados en artículos bibliográficos. Los tipos virales estudiados fueron 6, 11, correspondientes a bajo riesgo y 16, 18, 30, 33, 35, 45, 51 y 52. de alto riesgo.

**5.4.6.1. Diseño de Iniciadores.** El diseño de los iniciadores para la amplificación de las regiones E6 y E7 se realizo, buscando la región más conservada de la secuencia de aminoácidos de los tipos virales seleccionados en el gen back, después se propuso la secuencia de nucleótidos para los iniciadores antisentido y sentido de cada región.



Los iniciadores diseñados para cada región se muestran en las siguientes tablas; se presentan dos tablas para cada región debido a que se utilizan dos cebadores por cada una, es decir los iniciadores sentido y los antisentido para la Región E6 y la Región E7: (**Tablas 11 y 12**) corresponden a los iniciadores de la región E6

**Tabla 11.** Iniciadores diseñados para la amplificación de la región E6 Directa.

Iniciador	Tipo viral	Tm (°C)	Tamaño del fragmento
TT AAT TGT GTG TTT TGC AAG	6	52	198
TT CAG TGC GTG TTT TGC AGG	11	60	270
TA GAA TGT GTG TAC TGC AAG	16	56	370
TA ACC TGT GTA TAT TGC AAG	18	54	385
TA CAG TGT GTA TAT TGC AAG	30	54	258
TG AAT TGT GTC TAC TGC AAA	31	54	365
TA CAG TGC GTG GAA TGC AAA	33	58	364
TG AAT TGT GTA TAC TGC AAA	35	52	364
TT GCC TGT GTA TAT TGC AAA	45	54	385
TA GTG TGT GTG TAT TGT AAA	51	54	396
TT CAG TGT GTG CAG TGC AAA	52	58	361



**Tabla 12.** Iniciadores diseñados para la amplificación de la Región E6 Inversa.

Iniciador	Tipo viral	Tm (°C)
TGT TTA GTT TCT TCT TCA AC	6	52
TGC TTT AGT TTT TCT ATT TC	11	50
CAG CTG GGT TTC TCT ACG TG	16	62
TAC TTG TGT TTC TCT GCG TC	18	58
TAA CTG TTT TTC CTC TGG TG	30	56
CAC TTG GGT TTG AGT ACG AG	31	60
CAG TGC AGT TTC TCT ACG TC	33	60
CAC CTC GGT TTC TCT ACG TG	35	62
TAC TTG TGT TTC CCT ACG TC	45	58
CAC TTG GGT TTC GTT ACG TT	51	58
CAC TTG GGT TAC AGG TCG GG	52	64



Las (Tablas 13 y 14) muestran los iniciadores de la región E7

**Tabla 13.** Iniciadores diseñados para la amplificación de la Región E7 Directa.

Iniciador	Tipo viral	Tm(°C)	Tamaño del fragmento
AGC TCA GAA GAT GAG GTG GA	6, 11	60	97
AGC TCA GAG GAG GAG GAT GA	16	62	103
AGC GAC TCA GAG GAA GAA AA	18	58	121
ACG TCA GAG GAA GAG GAT GA	30	60	202
AGC TCA GAT GAG GAG GAT GT	31	60	100
AGC TCA GAT GAG GAT GAA GG	33	60	97
ACG TCA GAG GAG GAG GAA GA	35	62	103
AGC GAG TCA GAG GAG GAA AA	45	60	118
AGC TCA GAG GAG GAG GAT GA	51	62	112
AGC TCA GAT GAG GAG GAT AC	52	60	106



**Tabla 14.** Iniciadores diseñados para la amplificación de la Región E7 Inversa.

Iniciador	Tipo viral	Tm(°C)
TT GCT GTC ACA TCC ACA GCA	6, 11	60
AG CGT AGA GTC ACA CTT GCA	16	60
AT TCT GGC TTC ACA CTT ACA	18	56
GC AGA CGC ACA CCT ACA ACA	30	62
GT AGA CTT ACA TCG ACA ACA	31	56
GT GTT ACT AGT GTG ACA ACA	33	56
GT CGC CTC ACA TTT ACA ACA	35	58
CT GCC GTC ACA CTT ACA ACA	45	60
AC ACT TGA ACA CCT GCA ACA	51	58
GT GCT ATC ACA ACT GTG ACA	52	58



**5.4.7 Amplificación de regiones del VPH E6 y E7.** La amplificación se realizó para los genes E6 y E7 en 2 etapas, la primera una amplificación múltiplex y la segunda con pares de primers específicos para los tipos virales

La estandarización del método ya ha sido validada en el laboratorio en donde se realizó este estudio (Valdivia Alejandra 2004).

**5.4.7.1 Amplificación PCR múltiplex.** Se agruparon los 11 tipos virales en 2 grupos, uno perteneciente a la región E6 y otro E7, a su vez estos se dividieron en dos para facilitar la visualización de las bandas de los amplificadores de cada tipo viral. (**Tabla 15**) Quedando de la siguiente forma:

**Tabla 15** Acomodo tipos virales en de grupos para la amplificación por PCR múltiplex

<b>Región E6</b>		<b>Región E7</b>	
<i>Grupo A</i>	<i>Grupo B</i>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>
6,11, 30, 31, 35, 45, 51	16, 18, 33, 52	6, 11, 18, 30, 35, 51	16, 31, 33, 45, 52

A continuación se muestra el tamaño del amplificado para cada tipo viral del VPH para las regiones E6 y E7. (**Tabla 16**). Se encuentran acomodados por grupos y regiones



**Tabla 16** Tamaño de amplificado de cada tipo viral para las regiones E6 y E7.

<b>E6</b>			
<b>GRUPO</b>	<b>TIPO</b>	<b>(pb)</b>	<b>Tm</b>
A	6	198	52-52
A	11	270	50-60
A	30	258	52-60
A	31	365	54-60
A	35	364	52-62
A	45	385	54-58
A	51	396	54-58
B	16	370	56-62
B	18	385	54-58
B	33	364	58-60
B	52	361	58-64

<b>E7</b>			
<i>GRUPO</i>	<i>TIPO</i>	<i>(pb)</i>	<i>Tm</i>
1	6	97	60
1	11	97	60
1	18	121	58
1	30	202	60-62
1	35	103	60
1	51	112	60
2	16	103	62
2	31	100	58-60
2	33	97	58
2	45	118	60
2	52	106	58



En la (Tabla 17), se muestra los componentes y cantidades para la mezcla maestra de la PCR. Las condiciones óptimas para la amplificación de las regiones E6 y E7 en una PCR múltiplex se muestran en la (Tabla 18). Cabe señalar que las distintas temperaturas de alineamiento se deben a la diferencia de las temperaturas de alineamiento de cada uno de los iniciadores, ya que se encuentra varios en un solo tubo de reacción.

**Tabla 17.** Condiciones de la PCR Múltiplex.

<b>Master Mix</b>	
Taq DNA polimerasa	0.6 uL
dNTP's 10mM	0.25 uL
MgCl <sub>2</sub> 5 mM	1.5 uL
E6Af 20 mM	2 uL
E6Ar 20 mM	2 uL
Buffer 10X	2 uL
Agua	11.65 uL

**Tabla 18.** Condiciones de la PCR Múltiplex

Desnaturalización:	95°C	2 min
<b>10 ciclos de:</b>		
Desnaturalización:	95°C	30s
Alineamiento:	60°C	30s
Extensión:	72°C	30s
<b>10 ciclos de:</b>		
Desnaturalización:	95°C	30s
Alineamiento:	59°C	30s
Extensión:	72°C	30s
<b>10 ciclos de:</b>		
Desnaturalización:	95°C	30s
Alineamiento:	58°C	30s
Extensión:	72°C	30s

**Se realizan 30 ciclos.**



**5.4.7.2 Amplificación con Iniciadores Específicos.** Posterior al análisis de los amplificados por PCR múltiplex se realizó la amplificación de los posibles tipos virales por pares de iniciadores específicos. Las condiciones de la PCR con iniciadores específicos se muestran en la (Tabla 19)

**Tabla 19.** Condiciones de la PCR con Iniciadores Específicos

<b>Programa del termociclador</b>	
Desnaturalización:	95°C 2 min
<b>5 ciclos de:</b>	
Desnaturalización:	95°C 30s
Alineamiento:	60°C 30s
Extensión:	72°C 30s
<b>10 ciclos de:</b>	
Desnaturalización:	95°C 30s
Alineamiento:	58°C 30s
Extensión:	72°C 30s
<b>10 ciclos de:</b>	
Desnaturalización:	95°C 30s
Alineamiento:	57°C 30s
Extensión:	72°C 30s
<b>10 ciclos de:</b>	
Desnaturalización:	95°C 30s
Alineamiento:	56°C 30s
Extensión:	72°C 30s
<b>5 ciclos de:</b>	
Desnaturalización:	95°C 30s
Alineamiento:	55°C 30s
Extensión:	72°C 30s



**5.4.7.3. Detección del Genotipo de VPH.** La detección se realizó por electroforesis en gel de agarosa al 3.5% en TBE 1.0x a 75 volts por 90 min., visualizados con bromuro de etidio. Las muestras (10  $\mu$ l amplificado) fueron cargadas con buffer de carga blue juice (2  $\mu$ l), se colocó marcador de peso molecular de (123 pb y 10 pb) para identificar el tamaño del amplificado esperado. Se visualiza en un transiluminador de luz UV.

El análisis fue identificando los amplificados por medio del tamaño, ya que cada uno de los tipos virales presenta un tamaño de amplificación diferente. Se estableció como amplificación negativa para el tipo viral del VPH en ausencia de la banda de tamaño esperado.



### 5.5 Diagrama de flujo del diseño experimental.

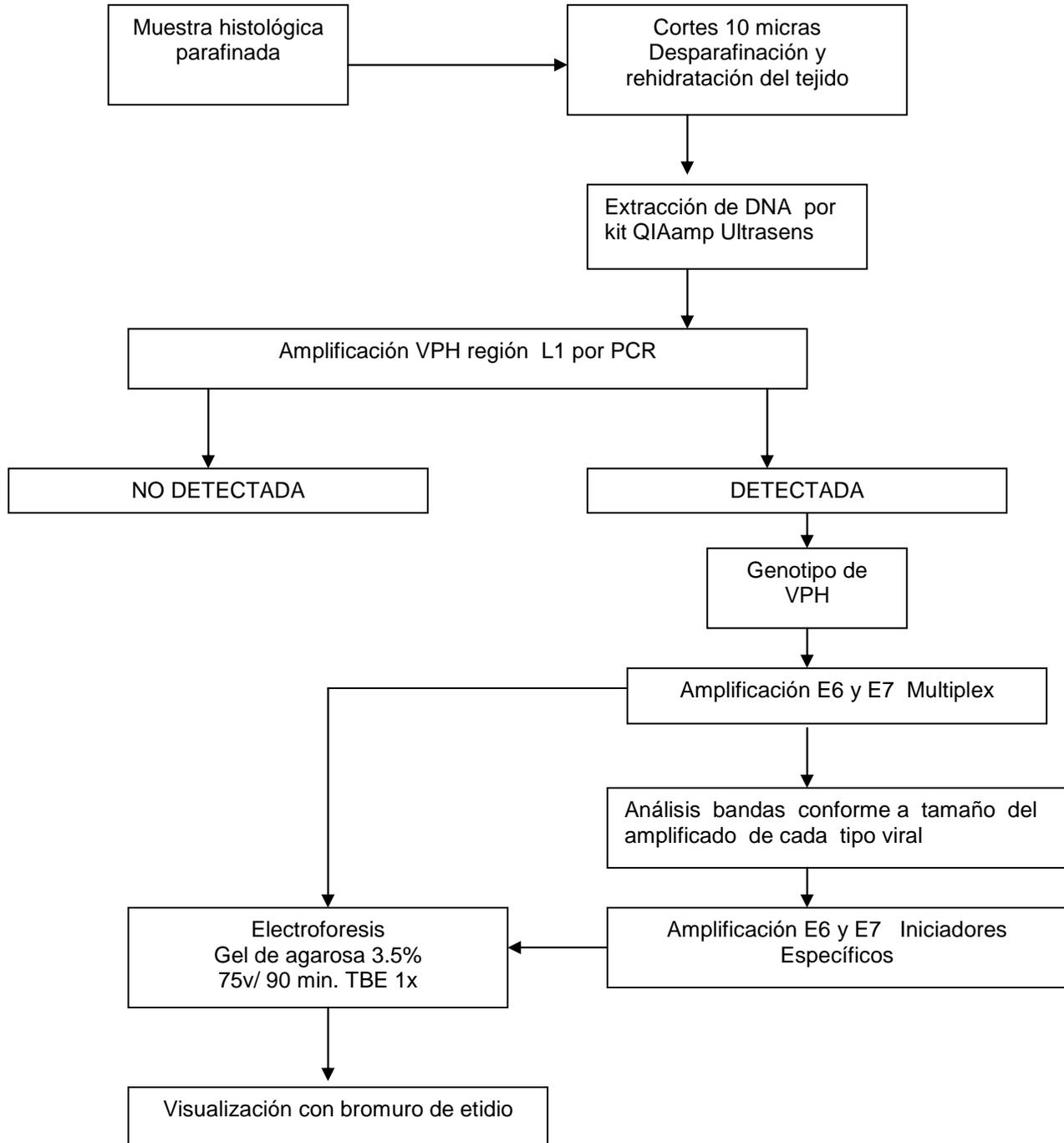


Diagrama de flujo elaborado a partir de datos de Gallegos (2006)



## VI. . RESULTADOS

### 6.1 Detección de VPH por PCR.

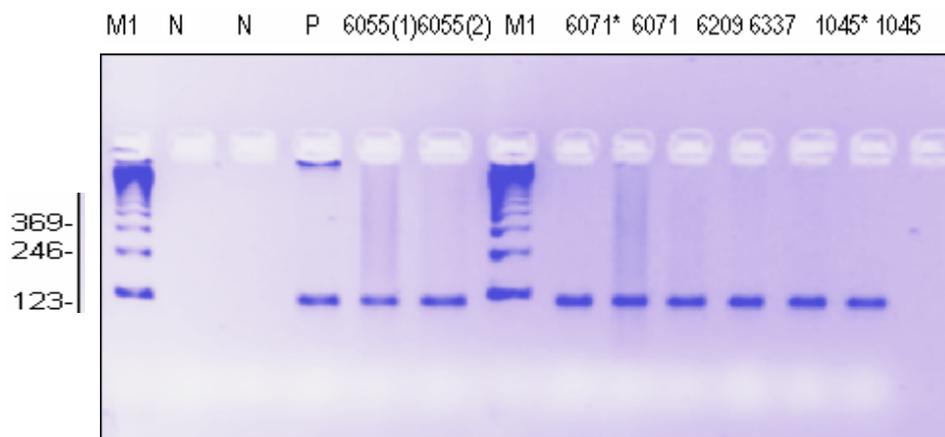
La detección de VPH se realizó en 143 muestras (cortes histológicos con alteraciones celulares y con distintos grados de neoplasia intraepitelial (NIC). El sistema de L1 por PCR detectó el VPH en 35.7% (51/ 143) de las muestras. Se ordenaron respecto al diagnóstico histológico y se encontró que el 28.6% pertenecientes a NIC I (18/63); 50% a NICII (20/40); y el 33.3% respecto a NIC III (13/ 40). Cabe señalar que un resultado es detectado si se amplifica el control interno ( $\beta$ -actina y la región L1 del VPH). En nuestro estudio se obtuvo el 100% (143/143) la amplificación de beta-actina. En anexo (II) se encuentran un listado de muestras utilizadas para extracción de ácidos nucleicos y detección de VPH por amplificación de la región L1 por PCR, con su código interno, diagnóstico histológico y diagnóstico molecular.

La detección del VPH por amplificación de la región L1 y su control interno se realizó en dos formas por gráficas de tiempo real y por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio.

### 6.1.1. Detección de VPH y $\beta$ -actina por electroforesis.

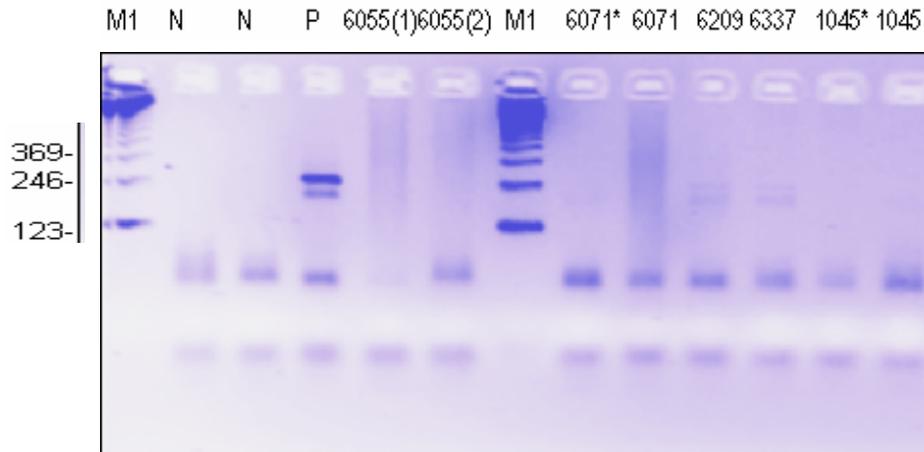
En las siguientes figuras se puede observar el corrimiento electroforetico, tanto de  $\beta$ -actina como de la región L1 del VPH (**Figuras J-L**).

#### Amplificación de B- actina Control Interno

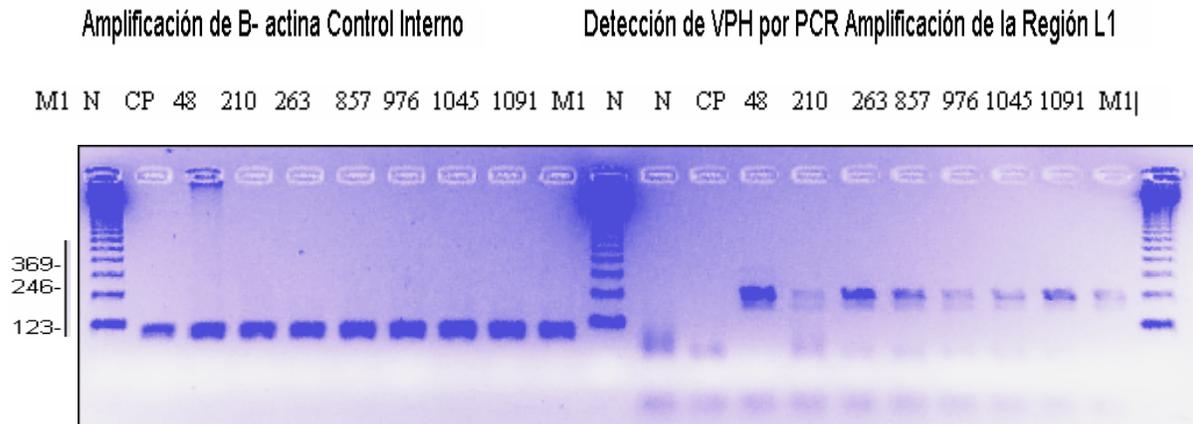


**Figura.-J** Amplificación de  $\beta$ -actina con iniciadores específicos. Donde **M1** corresponde marcador peso molecular de **123 pb**, **N** es control negativo de agua y **P** al control positivo para el gen B-actina. En cada pozo siguiente se encuentra las muestras identificadas con número interno. El amplificado esperado para este gen es de 123 pb aproximadamente.

### Detección de VPH por PCR Amplificación de la Región L1



**Figura.-K** Amplificación de la región L1 del VPH con iniciadores específicos. Donde **M1** corresponde marcador peso molecular de **123 pb**, **N** es control negativo de agua y **P** es control positivo de **VPH**. En cada pozo siguiente se encuentra las muestras identificadas con número interno. El amplificado esperado para la **región L1** es de **246 pb** aproximadamente.



**Figura.-L** Amplificación de la región L1 del VPH y  $\beta$ -actina con iniciadores específicos .En cada pozo siguiente se encuentra las muestras identificadas con número interno. El amplificado esperado para  $\beta$ -actina es de **123 pb** y para la **región L1** de **246 pb** aproximadamente.

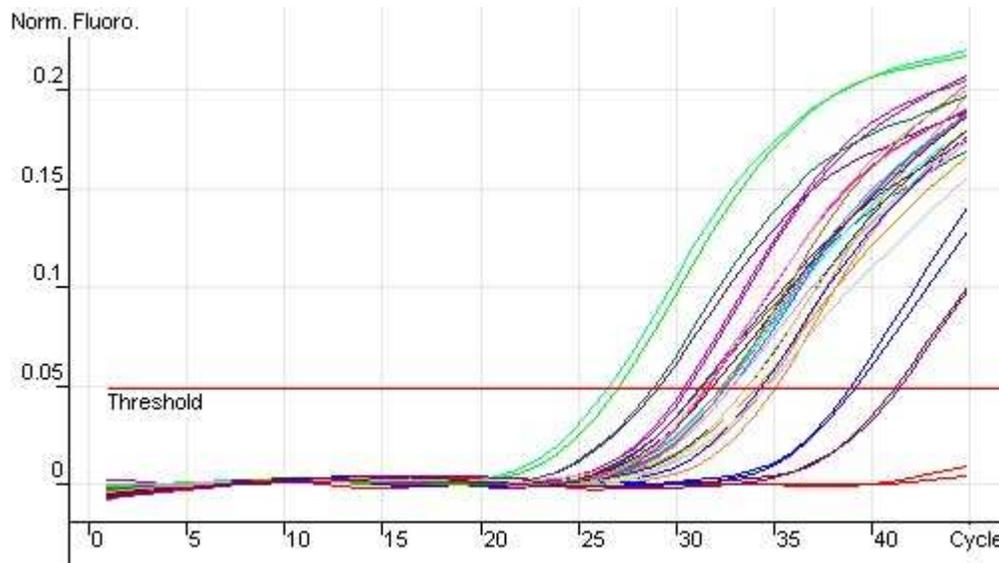
### 6.1.2. Detección de VPH y $\beta$ -actina por PCR tiempo real.

Graficas de tiempo real de la amplificación de  $\beta$ -actina como control interno de cada muestra a detectar el VPH. (**Graficas 5 y 6**)



**Gráfica 5.** PCR en tiempo real para la amplificación  $\beta$ -actina.

**Información sobre la cuantificación B-actina en cada ciclo con FAM.**



En la (**Tabla 20**) se observa el orden de los controles y de las muestras para la amplificación de  $\beta$ -actina.

**Tabla 20.**

No.	Color	Muestra o control
1	Red	CN
2	Red	CN
3	Green	Standar B-1
4	Light Green	Standar B-1
5	Magenta	Standar B-2
6	Purple	Standar B-2
7	Orange	Standar B-3
8	Light Orange	Standar B-3
9	Blue	Standar B-4
10	Light Blue	Standar B-4



No.	Color	Muestra	Tipo
11		H-3350 05/01/06	
12		H-4033	Unknown
13		H-4711	Unknown
14		H-4759	Unknown
15		H-4797	Unknown
16		H-2092	Unknown
17		H-3012	Unknown
18		H-3225	Unknown
19		H-4711	Unknown
20		H-485-2 01/02/06	Unknown
21		H-1833	Unknown
22		H-1872	Unknown
23		H-3115-1	Unknown
24		H-4711	Unknown
25		H-4711	Unknown
26		H-5722	Unknown
27		H-5739	Unknown
28		H-5761	Unknown
29		H-6117	Unknown
30		H-6338	Unknown
31		CN EXT	Unknown
32		CN EXT	Unknown

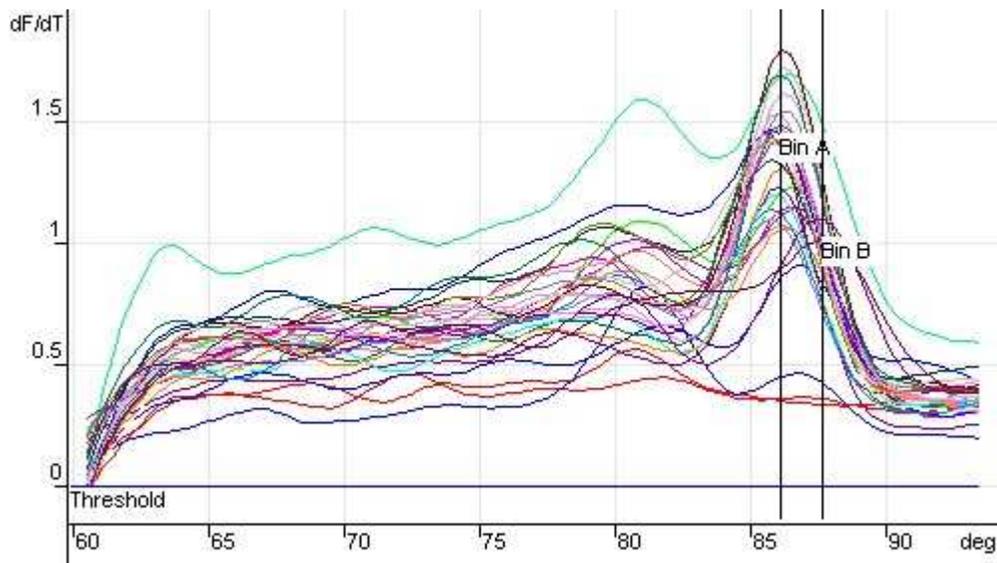
CN= Control negativo de amplificación agua  
CN EXT= Control negativo de extracción

Este reporte fue generado por el instrumento rotor Gene en Tiempo real Corbett Research 2004 con el software de análisis 6.0



**Gráfica 6.** PCR en tiempo real para la amplificación  $\beta$ -actina. Donde se observa la temperatura de desnaturalización del producto en 86 grados, además de productos inespecíficos que son los otros picos.

**Información de la curva de desnaturalización del amplicon con FAM**



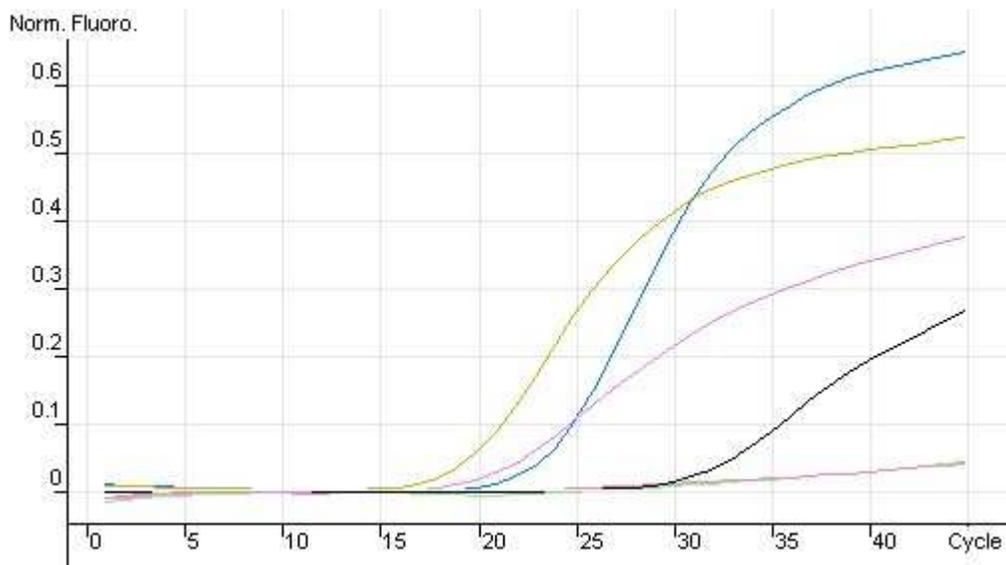
Este reporte fue generado por el instrumento rotor Gene en Tiempo real Corbett Research 2004 con el software de análisis 6.0



Gráficas de Tiempo real de la amplificación de la región L1 para la detección de VPH. (**Graficas 7 8**)

**Gráfica 7.-** PCR en tiempo real para la amplificación L1 del VPH. Donde se puede observar que existen 6 muestras positivas a VPH

**Información sobre la cuantificación VPH en cada ciclo con Sybr-green**



En la (**Tabla 21**) se observa el orden las muestras para la detección de VPH por la amplificación de la región L1.



Tabla 21 orden de las muestras

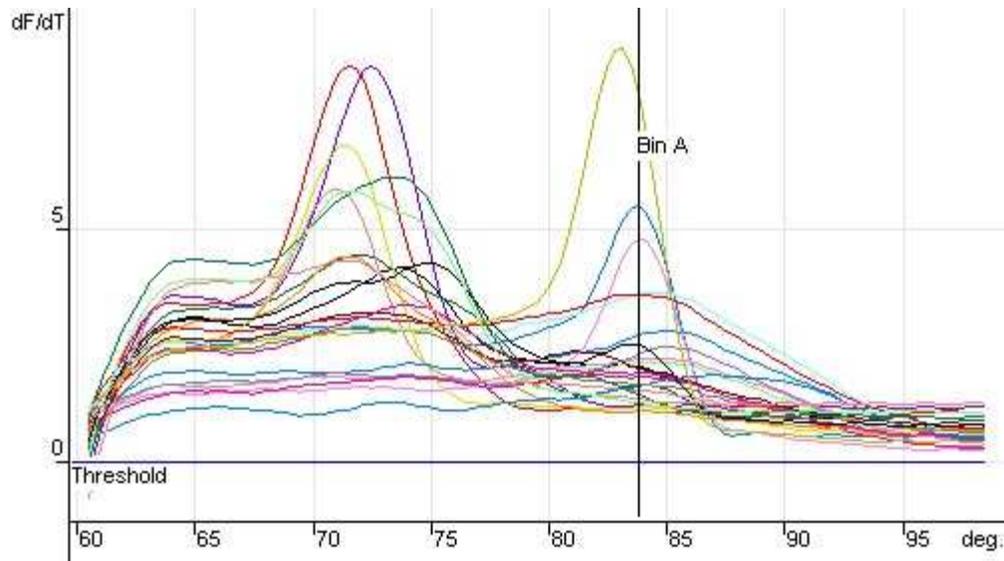
No.	Color	Muestra	Tipo
1		CN	Control Negativo
2		CN	Control Negativo
3		CP	Control Positivo
4		M-217	Unknown
5		M-630	Unknown
6		M-1833	Unknown
7		M-1872	Unknown
8		M-2148	Unknown
9		M-2459	Unknown
10		M-2564	Unknown
11		M-2668	Unknown
12		M-3350	Unknown
13		M-3354	Unknown
14		M-3424	Unknown
15		M-3548	Unknown
16		M-3545	Unknown
17		M-3581	Unknown
18		M-3611	Unknown
19		M-5768	Unknown
20		M-5775	Unknown
21		M-6023	Unknown
22		M-6209	Unknown
23		M-ch2	Unknown
24		M-ch3	Unknown
25		CN Ext.	Unknown

Este reporte fue generado por el instrumento rotor Gene en Tiempo real Corbett Research 2004 con el software de análisis 6.0



**Gráfica 8.-** PCR en tiempo real para la amplificación L1 del VPH. Donde se observa que la  $T_m$  para el producto de VPH región L1 es de  $83.8^\circ$  grados

**Información de la curva de desnaturalización del amplicon con Sybr-green.**



**Tabla 22.** Donde se encuentran las muestras procesadas en la amplificación de VPH., también se puede observar la temperatura de desnaturalización del amplicon, que para el VPH es de  $83.8^\circ$  (control positivo), las muestras son detectadas si la temperatura es igual o muy próxima (no mayor a  $3^\circ$  a la derecha o izquierda del pico control). Los otros picos que se observan son inespecíficos, para dar un resultado confiable es necesario el análisis de la curva de cuantificación y el pico correspondiente a la temperatura de melting.



**Tabla 22** Temperatura de desnaturalización del producto VPH- L1

No.	Muestra	Pico Tm	Pico Tm	Pico Tm
1	CN	86.8 (Bin A)	91.5	95.7
2	CN	78.5	90.2	94.2
3	CP	83.8 (Bin A)	88.8	92.7
4	M-217			
5	M-630	84 (Bin A)	91.2	95.8
6	M-1833			
7	M-1872	84.3 (Bin A)		
8	M-2148	70	74	84.5 (Bin A)
9	M-2459	84.5 (Bin A)		
10	M-2564	74.2	85 (Bin A)	
11	M-2668	74.5	84.5 (Bin A)	
12	M-3350	72	84 (Bin A)	
13	M-3354	74.3	85.2 (Bin A)	
14	M-3424	82 (Bin A)		
15	M-3548	81.5 (Bin A)		
16	M-3545	79.3	87.3 (Bin A)	
17	M-3581			
18	M-3611	83.8 (Bin A)		
19	M-5768			
20	M-5775	83 (Bin A)		
21	M-6023	75	83.5 (Bin A)	

Este reporte fue generado por el instrumento rotor Gene en Tiempo real Corbett Research 2004 con el software de análisis 6.0



### Genotipo de VPH por PCR

Se realizó el genotipo del VPH a las 51 muestras detectadas. Primero las muestras se sometieron a una amplificación múltiple o por grupos de las regiones E6 y E7 para realizar el tamizaje entre los posibles tipos virales presentes en cada muestra, posterior al análisis de los amplificadores obtenidos, relacionando el tamaño y grupo, se realizó la amplificación específica de los tipos virales seleccionados, y finalmente se obtuvo el genotipo del tipo y/o tipos virales implicados en cada una de las muestras. Se logró genotipificar (39 / 51) muestras, las restantes 12; 6 se agotó el material ya que eran biopsias muy pequeñas y no se realizó el genotipo, estas se encuentran sombreadas en la tabla para su identificación. (**Tabla 23**); y las 6 restantes no se logró obtener el tipo viral presente en la misma.

**Tabla 23** Resultados obtenidos de la tipificación del Virus del Papiloma Humano en las 51 muestras procesadas.

#### NIC I

No	Cod. Interno	Resultado PCR múltiple	Resultado PCR Especifico
1	H-436	6,11,16,18,51	6, 11
2	H-725	18,45,51,16	18*
3	H-5722-1-04	16,31,33,52	16* y 51*
4	H-160-05		
5	H-188-05	18,16,45,31	16 y 31
6	H-485-2-05	6,11 y 33	16*
7	H-649-1-05	6, 11	6*
8	H-850-05	16,31,33,52	35* 16* y 11*
9	H-1671-05	16,18,31 y 33	
10	H-1967-05	18,45,51	51*
11	H-2072-05	16,31,33 y 45	30,45* y 51
12	H-2927-05	18,51	51*
13	H-3012-05	51,16,31 y 45	51
14	H-3350-05	33,45,51,18	45*
15	H-4033-05	35,31,16,6,11	16 y 11
16	H-4711-05	52,16	16
17	H-4797-2-05	6,11,35- 45,18,51	6, 51*
18	H-3892	16,31,52	16*



**NIC II**

19	H-570	16,18	16
20	H-857	11, 18 y 30	30
21	H-1091		
22	H-5739-04	18,51	18*
23	H-5768-04	16,31,45,52	16*,45*
24	H-5775-04	16,31,45,52	31 Y 16*
25	H-5949-04	16, 45, 31	/
26	H-6023-04	16,31,52,35,51	16
27	H-6337-04	16,18	16
28	H-6338-04	16, 45	16*
29	H-09	6,11,16,31,52,51 y 30	16, *51
30	H-217-05	35,51,6,11,16	6*,11*,35*
31	H-340-05	45,51	51
32	H-589-05	16, 18	16*
33	H-630-05	6, 11, 16	6* 16
34	H-1287-05	16,45,52	16
35	H-1872-05	18,31,52,16	"52, 16
36	H-3072-05	*	/
37	H-3225-05	31,16,52,18	16
38	H-4759-05	16,52,18*,45*,51*	51*

**NIC III**

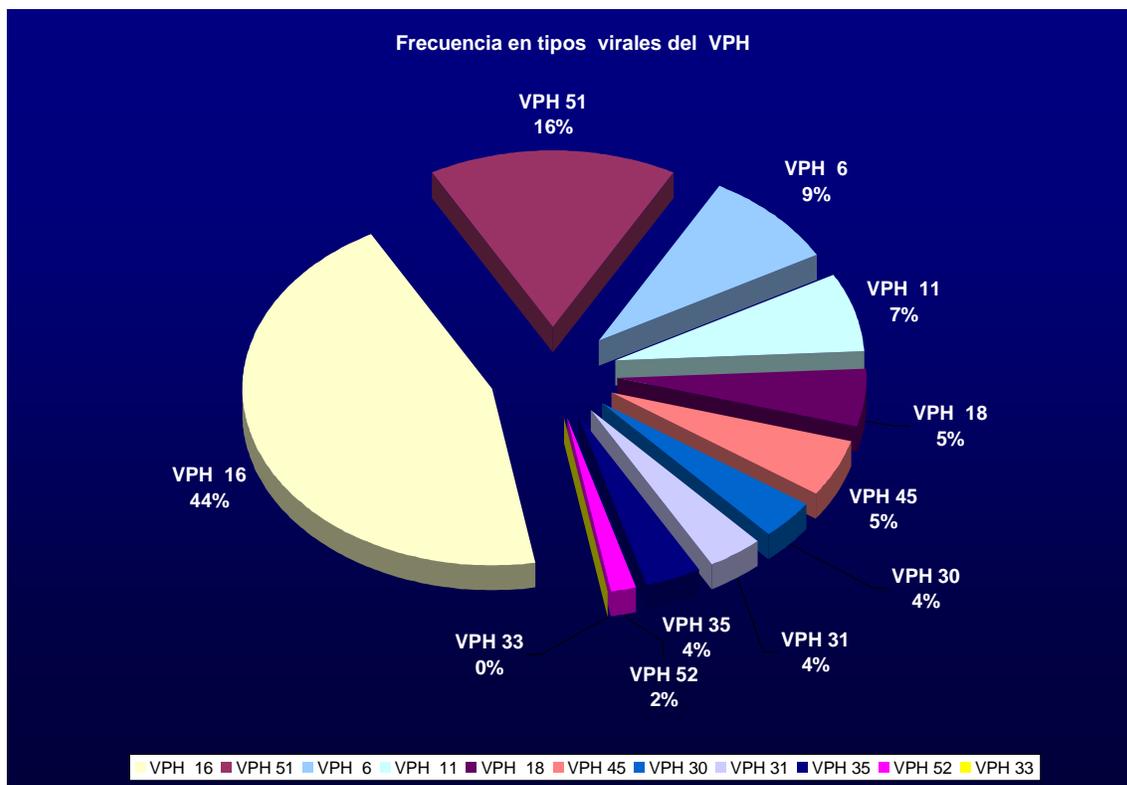
39	H-48		
40	H-210		
41	H-263		
42	H-312-05	16,18,31 y 52	/
43	H-721-05	18,51,16	16*,18*
44	H-976		
45	H-1045		
46	H-1833-05	16,31,52	16*
47	H-1893-05		/
48	H-5761-04	16,30,31,33	16*
49	H-5945-04	16,31,52,,51	16*
50	H-6117-04	16,30,31,33	16*
51	H-6209-04	31,33,52,51,16	16*

Nota: El (\*) significa que solo la región E7 se logro amplificar  
 El (/) significa que no se logro identificar el tipo viral presente en la muestra



### 6.2.1. Frecuencia de los tipos virales del VPH

La frecuencia respecto a tipos virales se representa en la (**Gráfica 9**), donde se puede observar que el tipo viral predominante es el VPH-16 seguido por el VPH-51, mientras que los otros se encuentran en menor proporción. En la (**Tabla 24**), se muestran los datos con los que se realizó el gráfico



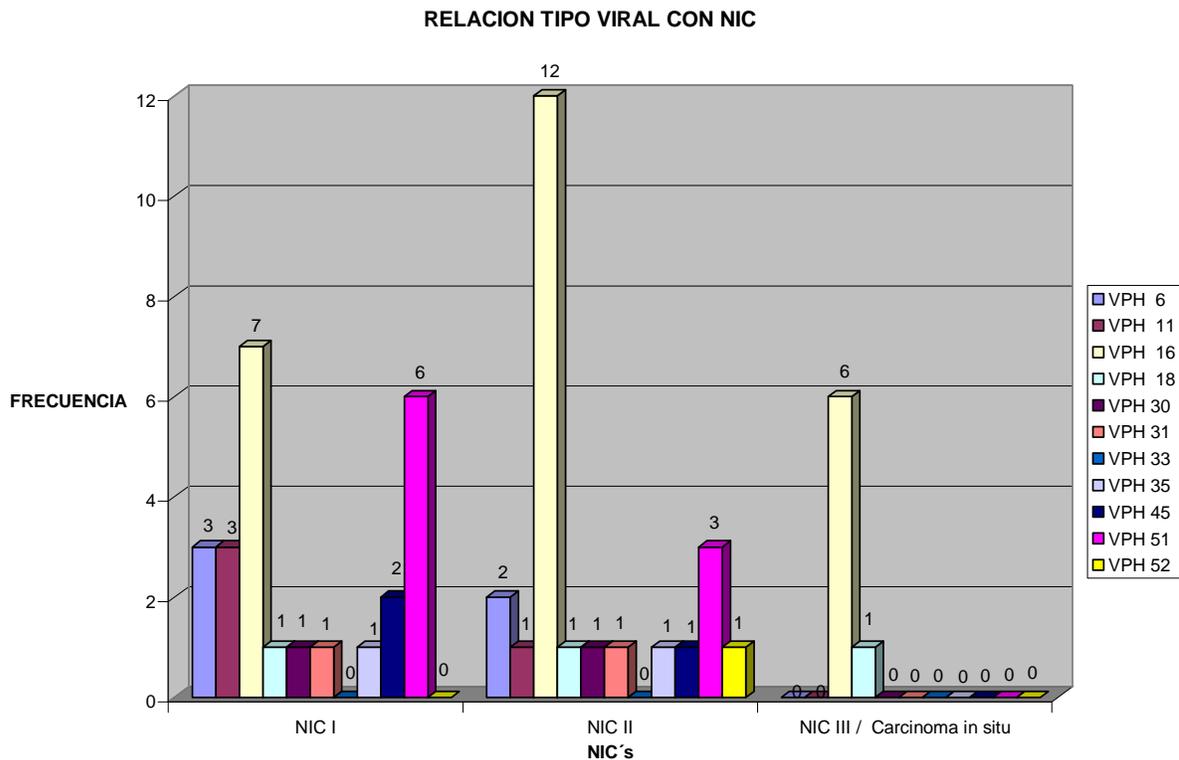
Gráfica 9



**Tabla 24.** Frecuencia encontrada de los 11 tipos virales en las 39 muestras.

	VPH 16	VPH 51	VPH 6	VPH 11	VPH 18	VPH 45	VPH 30	VPH 31	VPH 35	VPH 52	VH 33	
<b>Tot.</b>	25	9	5	4	3	3	2	2	2	1	0	<b>56</b>
<b>%</b>	44%	16%	9%	7.2%	5.3%	5.3%	3.6%	3.6%	3.6%	1.8%	0%	<b>100 %</b>

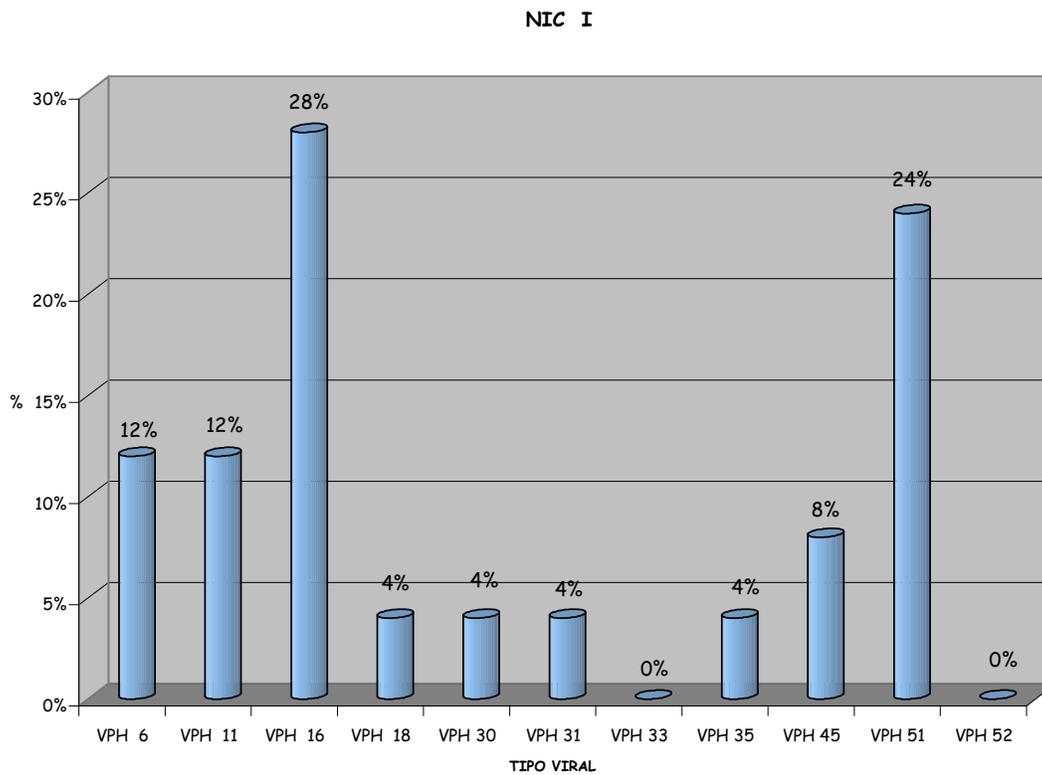
En el grafico se puede observar la frecuencia y prevaencia de los 11 tipos virales amplificados con respecto a el grado de neoplasia intraepitelial cervical (NIC) que presentaron en el estudio histológico. (**Gráfica 10**)



**Gráfica.-10** Ordenada por NIC donde se puede observar la frecuencia de cada tipo viral con respecto al diagnostico histológico.



Aquí se observa por separado la frecuencia y de genotipo de VPH en relación con el diagnóstico histológico para NIC I. Los tipos prevalentes fueron el VPH-16 con (28%) y el VPH-51 con (24%), mientras que los tipos virales de bajo riesgo VPH-6 y VPH-11 solo los presentaron el (12%) de las muestras (**Gráfica 11**).

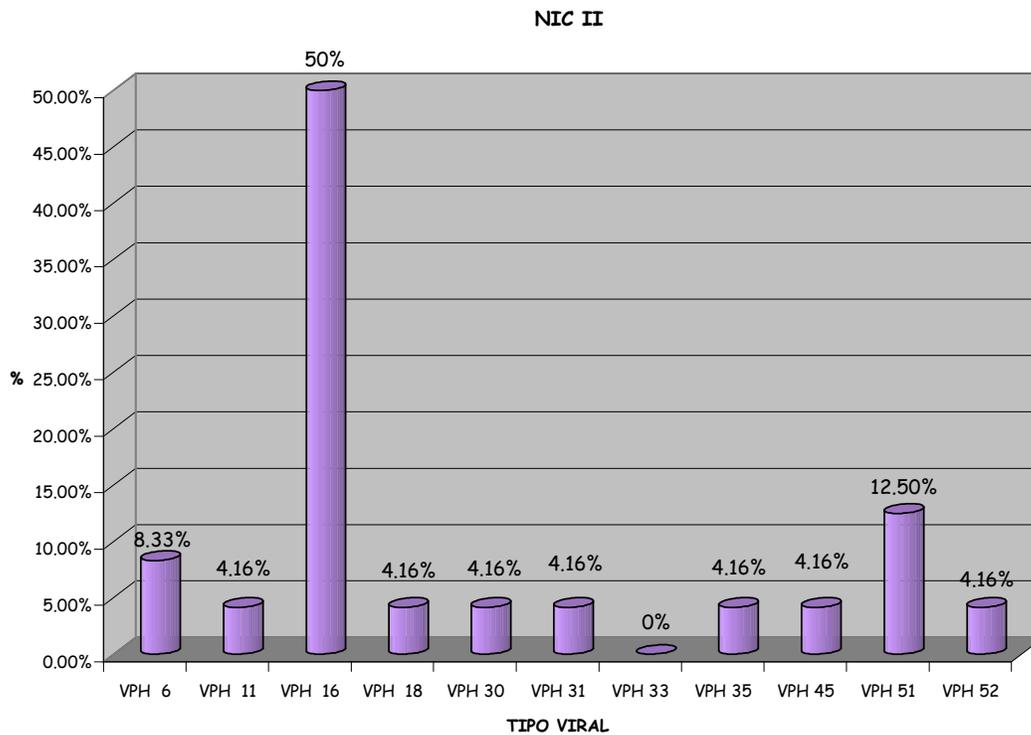


**Gráfica.-11** Donde se observa la frecuencia de cada tipo viral encontrados en las muestras diagnosticadas como NIC I



En el caso de la neoplasia NIC II se observa el mismo comportamiento, la prevalencia de los tipos virales VPH-16 y VPH-51 pero en distinta proporción, siendo muy frecuente el tipo VPH-16 con (50%) (**Gráfica 12**)

### Frecuencia de tipos virales en NIC II

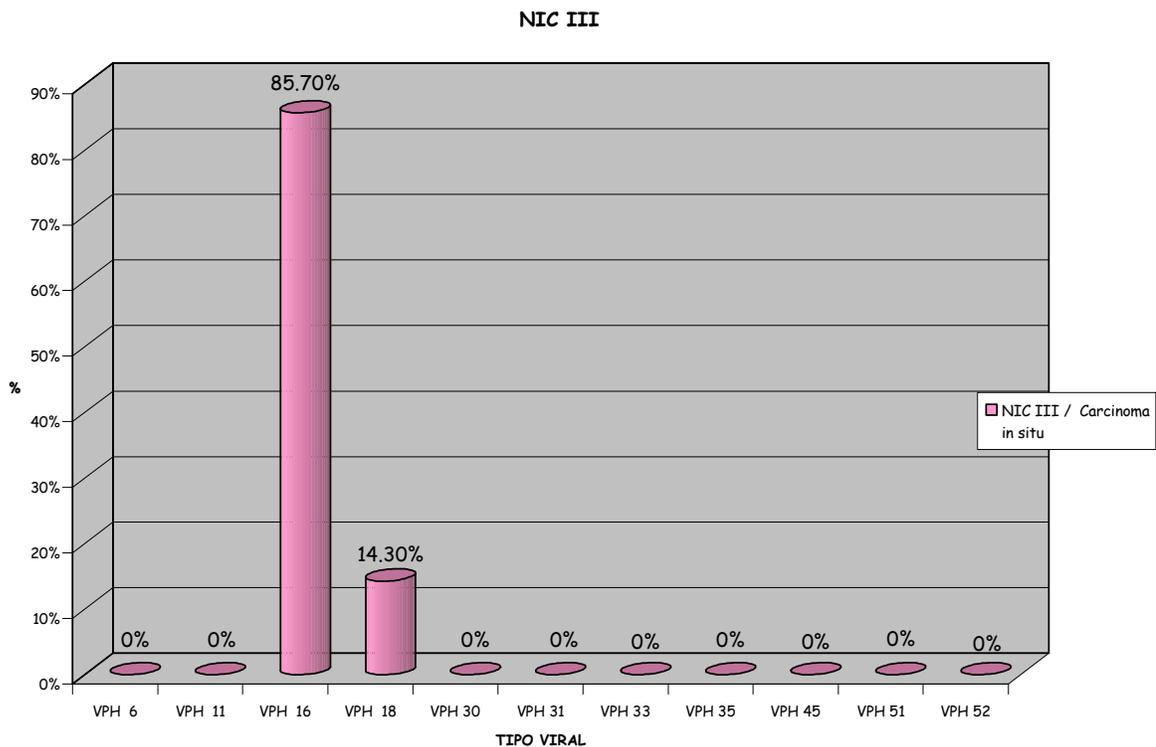


**Gráfica.-12** Donde se observa la frecuencia de cada tipo viral encontrados en las muestras diagnosticadas como NIC II



La relación de los tipos virales del VPH y la neoplasia NICIII es muy específica ya que solo los tipos virales VPH-16 con (85.7%) y el VPH-18 con (14.3%), fueron detectados. (**Gráfica 13**)

### Frecuencia respecto a NIC III



**Gráfica.-13** Donde se observa la frecuencia de cada tipo viral encontrados en las muestras diagnosticadas como NIC III



La frecuencia de tipos virales en las muestras procesadas y ordenados por al diagnostico histológico., se muestra en la (Tabla 25)

**Tabla 25**

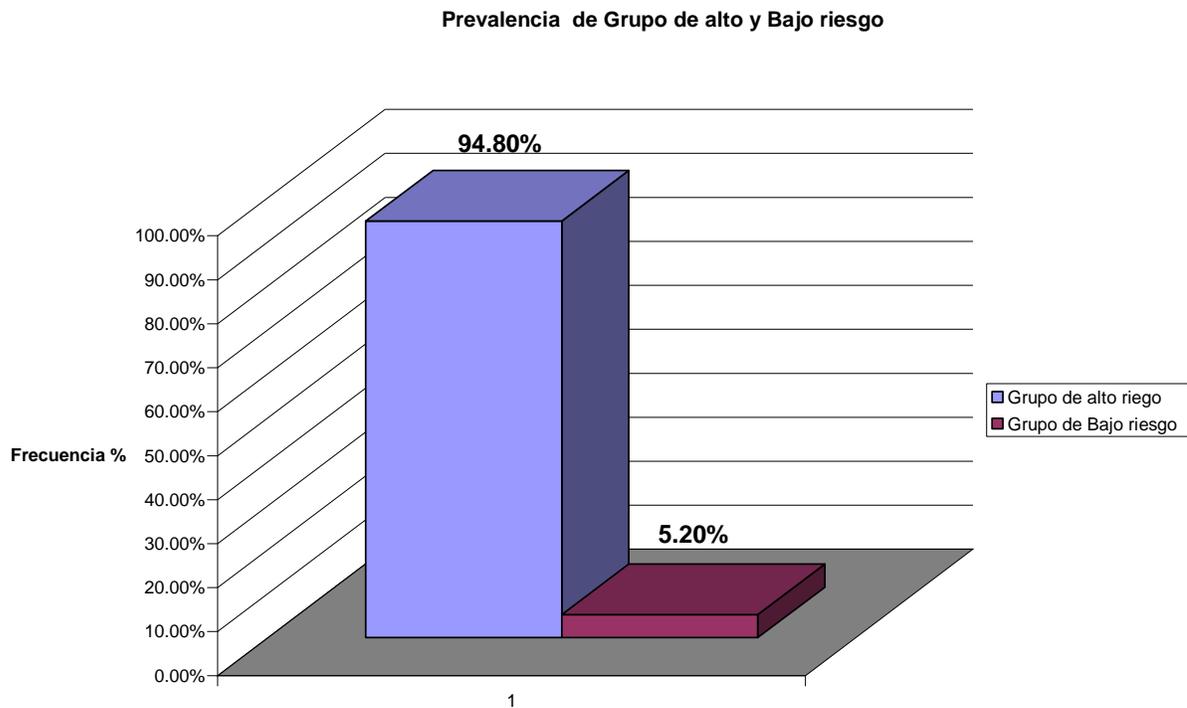
CATEGORÍA	VPH-6	VPH-11
NIC I	3	3
NIC II	2	1
NIC III / Carcinoma in situ.	0	0
<b>Total</b>	<b>5</b>	<b>4</b>
%	9%	7.20%

CATEGORÍA	VPH 16	VPH 18	VPH 30	VPH 31	VPH 33	VPH 35	VPH 45	VPH 51	VPH 52	Total
NIC I	7	1	1	1	0	1	2	6	0	25
NIC II	12	1	1	1	0	1	1	3	1	24
NIC III / Carcinoma in situ	6	1	0	0	0	0	0	0	0	7
<b>Total</b>	<b>25</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>9</b>	<b>1</b>	<b>56</b>
%	44%	5.30%	3.60%	3.60%	0%	3.60%	5.30%	16%	1.80%	100%

Se encontraron casos que incluyan más de un tipo viral presente en la muestra (Infecciones múltiples) 27.5 % (14 /51), lo que hay que resaltar en estas asociaciones es la presencia de tipos virales de bajo riesgo con los de alto riesgo en NIC I



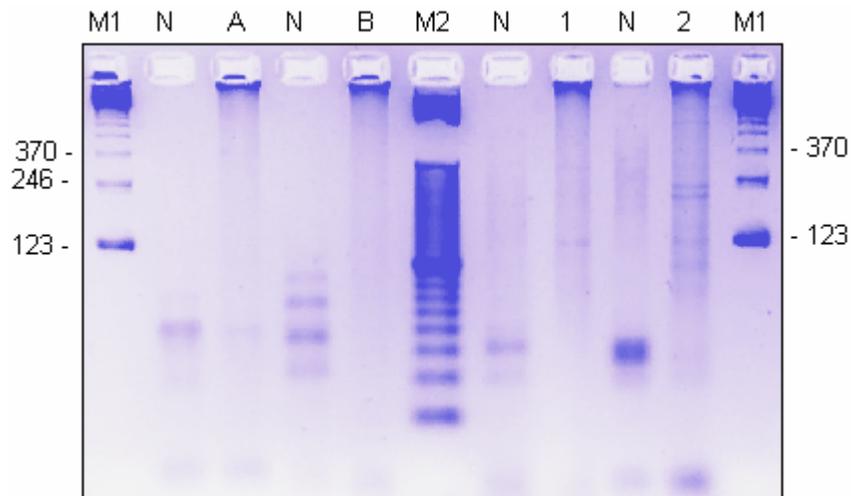
(Gráfica 14) donde se valora el comportamiento y la prevalencia del grupo de alto riesgo (16, 18, 30,31, 33,35, 45, 51, y 52) respecto a el bajo riesgo (6 y 11) en las muestras procesadas. Esta relación es similar en muestras de raspado endocervical procesadas por la metodología de captura de híbridos. (Dpto. de Biología Molecular 2006)



**Gráfica.-14** Prevalencia del grupo de alto riesgo respecto al de bajo riesgo

A continuación se describen los resultados obtenidos con las muestras procesadas. Cabe señalar que en algunas muestras se obtuvieron amplificados muy tenues o ausencia de estos en la amplificación por PCR múltiplex. Con respecto a la amplificación específica algunas solo se pudo obtener una región en particular la E7.

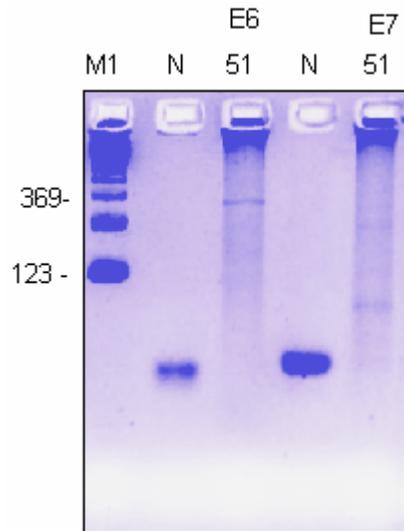
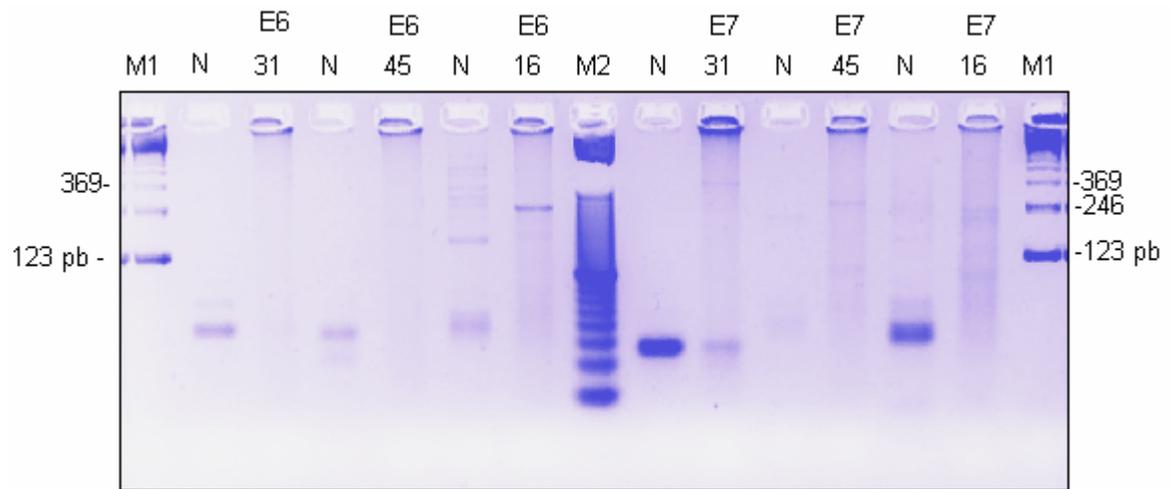
### AMPLIFICACIÓN POR PCR MULTIPLEX DEL GENOTIPO DE VPH



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo  
A = Grupo (A) E6: 6,11,30,31,35,45,51  
B = Grupo (B) E6: 16,18,33,52  
1 = Grupo (1) E7: 6,11,35,18,51,30  
2 = Grupo (2) E7: 31,33,45,52,16

**Figura.-M** Amplificación por PCR Multiplex organizada en grupo de la muestra (H3012). que pertenece a NIC I , para la que se sugieren el tipo viral 16 (103 pb) , 31 (100 pb) y 45(118 pb) por los amplificados del grupo 2 y el tipo 51(112 pb) por la banda del grupo 1 de acuerdo con la división de los grupos y el tamaño de los amplicones esperados. En la región E6 que pertenece al grupo A y B no se obtiene ningún amplificado.

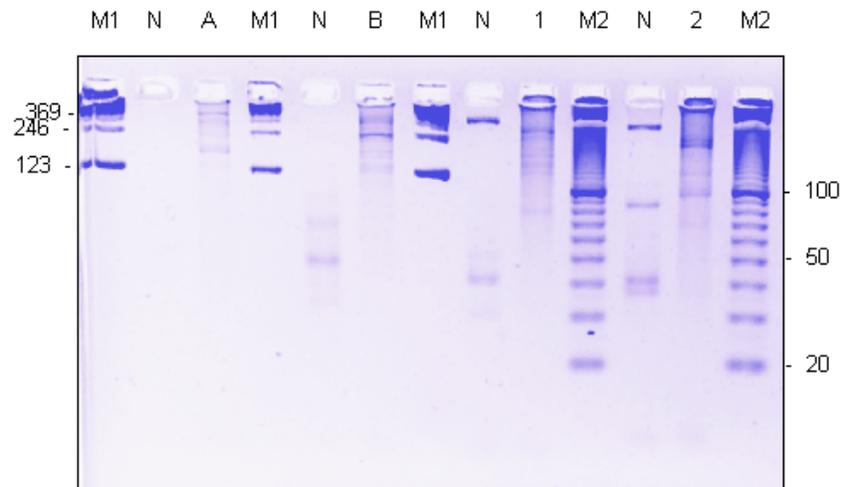
**AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA POR PCR  
DEL GENOTIPO DE VPH**



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo

**Figura.-N** Amplificación con iniciadores específicos de la muestra (H-3012) Se amplifico la región E6 y E7 de los tipos virales sugeridos 16, 31, 45 y 51. La amplificación del tipo viral esta representado con el número al que hace referencia y la región arriba de este como subíndice. El resultado tipo viral **51**

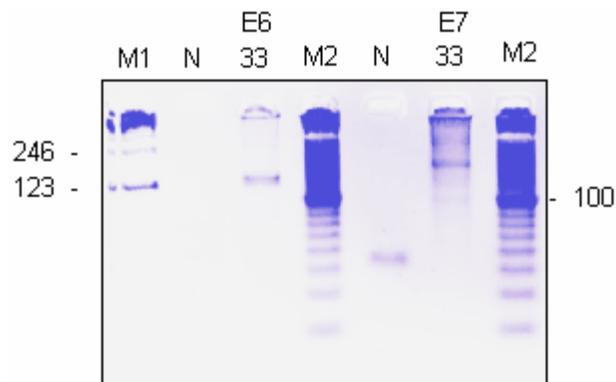
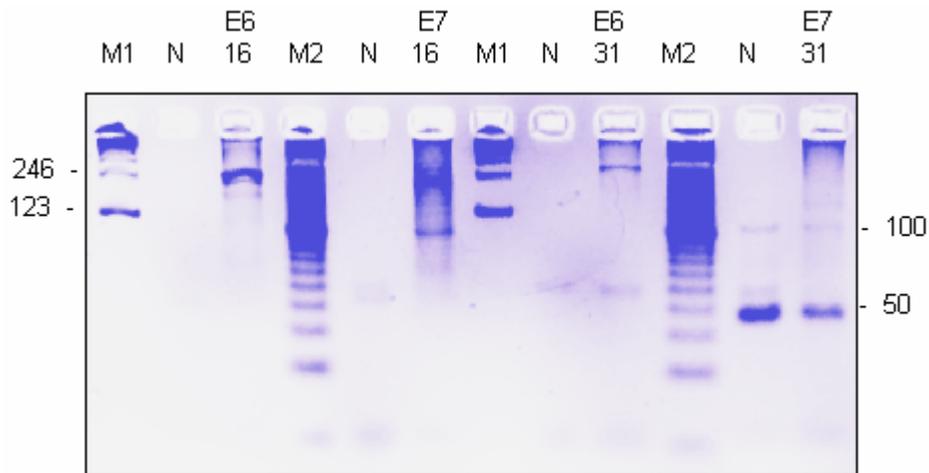
### AMPLIFICACIÓN POR PCR MULTIPLEX DEL GENOTIPO DE VPH



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo  
A = Grupo (A) E6: 6,11,30,31,35,45,51  
B = Grupo (B) E6: 16,18,33,52  
1 = Grupo (1) E7: 6,11,35,18,51,30  
2 = Grupo (2) E7: 31,33,45,52,16

**Figura.-O** Amplificación por PCR Multiplex por grupos de la muestra (H-188). Perteneciente a NIC I , para la cual se sugieren los tipos 16 , 31 y 33 por los amplificados del grupo 2 , 31 por la banda en el grupo A y 16 y 33 por las bandas en el grupo B de acuerdo con la división de los grupos y el tamaño de los amplicones esperados.

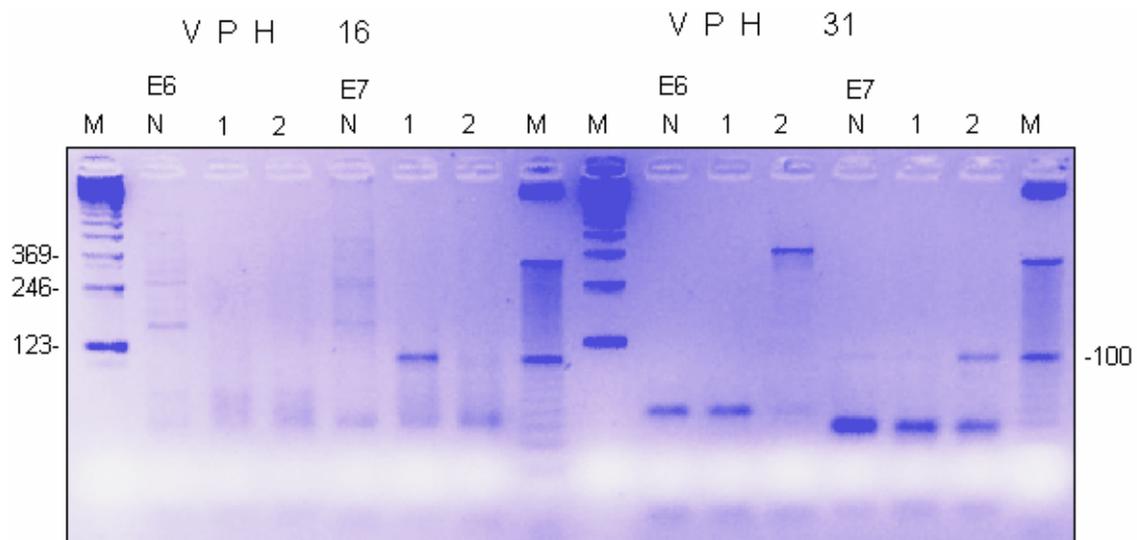
**AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA POR PCR  
DEL GENOTIPO DE VPH**



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo

**Figura.-P** Amplificación con iniciadores específicos de las regiones E6 y E7 para los tipos virales sugeridos 16, 31 y 33 de la muestra (H-188) La organización es la misma que se señaló en los otros geles El Resultado tipo viral **16 y 31**

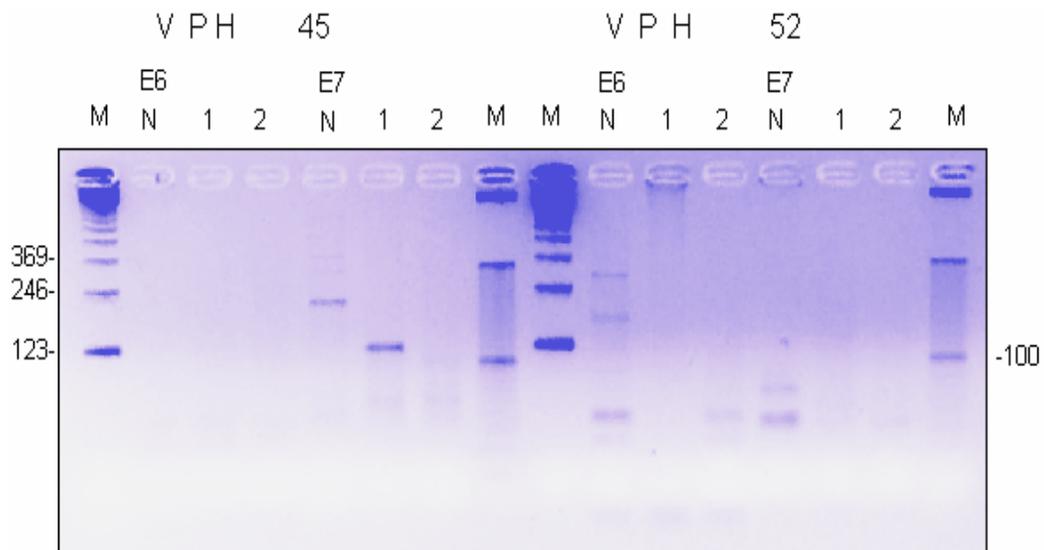
### AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA POR PCR DEL GENOTIPO DE VPH



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo

**Figura.-Q** Amplificación con iniciadores específicos de las regiones E6 y E7 para los tipos virales sugeridos 16, 31 de las muestras (1= **H-5768** y 2= **H-5775**) La organización es la misma que se señaló en los anteriores geles. El Resultado **H-5768** tipo viral **16** solo la región **E7**  
**H- 5775** tipo viral **31 y 16** la región **E7**

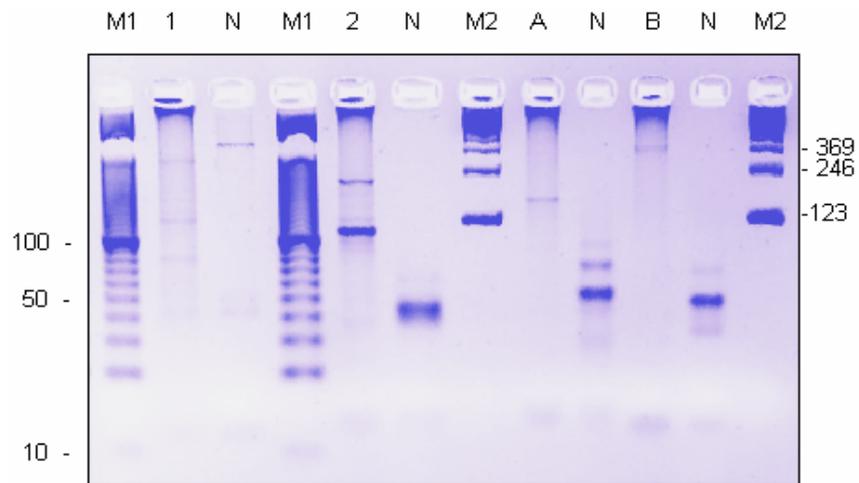
### AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA POR PCR DEL GENOTIPO DE VPH



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo

**Figura.-R** Amplificación con iniciadores específicos de las regiones E6 y E7 para los tipos virales sugeridos 45 y 52 de las muestras (1= H-5768 y 2= H-5775) La organización es la misma que se señaló en los anteriores geles. El Resultado H-5768 tipo viral 45 solo la región E7

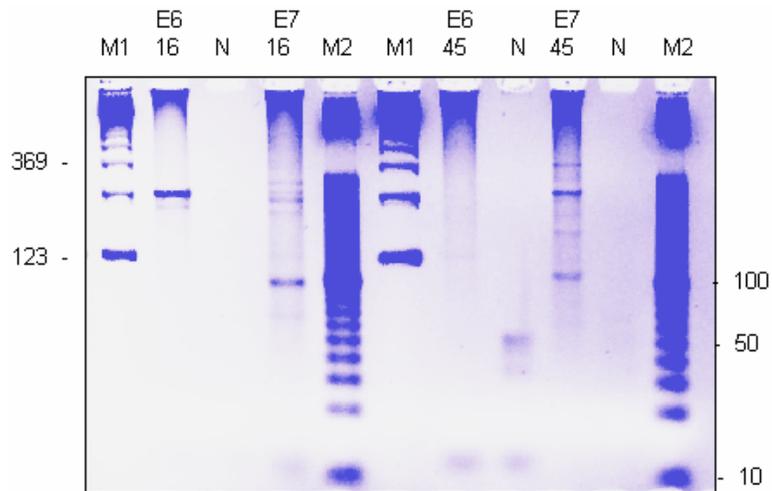
### AMPLIFICACIÓN POR PCR MULTIPLEX DEL GENOTIPO DE VPH



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo  
A = Grupo (A) E6: 6,11,30,31,35,45,51  
B = Grupo (B) E6: 16,18,33,52  
1 = Grupo (1) E7: 6,11,35,18,51,30  
2 = Grupo (2) E7: 31,33,45,52,16

**Figura.-S** Amplificación por PCR Multiplex organizada por grupos de la muestra (H-3072). Perteneciente a NIC II, para la cual se sugieren los tipos 16 y 45 por el amplificado del grupo 2, y 16 por la banda en el grupo B de acuerdo con la división de los grupos y el tamaño de los amplicones esperados.

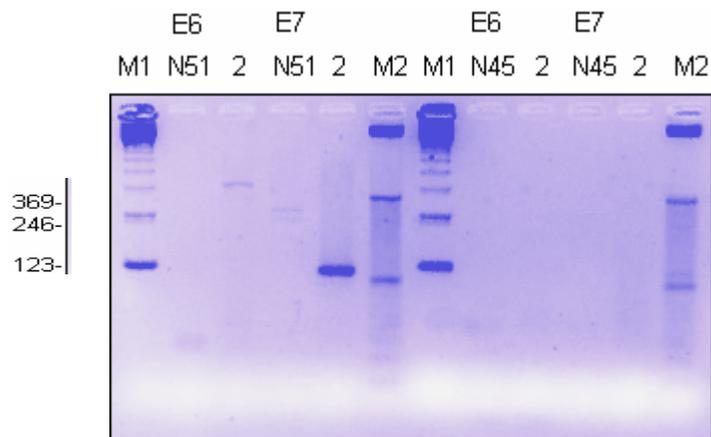
### AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA POR PCR DEL GENOTIPO DE VPH



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo

**Figura.-T** Amplificación con iniciadores específicos de las regiones E6 y E7 para los tipos virales sugeridos 16 y 45 de la muestra ( **H-3072** ) La organización es la misma que se señaló en los otros geles El Resultado tipo viral **16 y del 45** solo la región **E7**

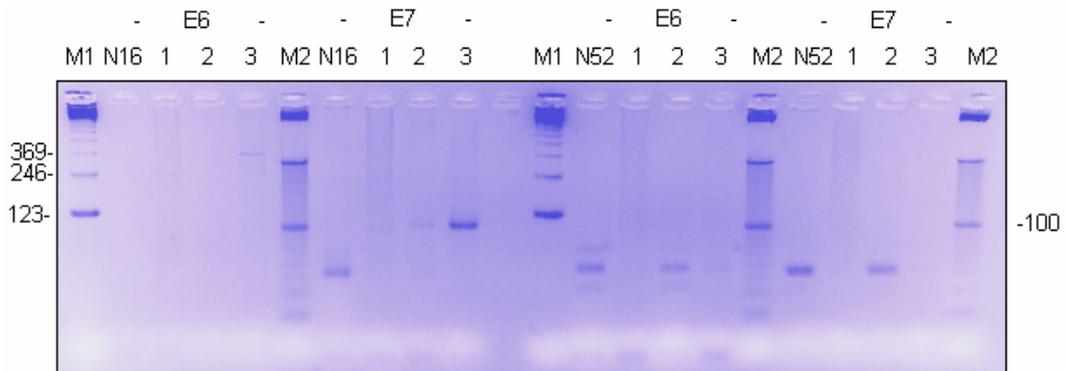
### AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA POR PCR DEL GENOTIPO DE VPH



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo

**Figura.-U** Amplificación con iniciadores específicos de las regiones E6 y E7 para los tipos virales sugeridos 51 y 45 de la muestra ( **H-340** ) La organización es la misma que se señaló en los otros geles E1 Resultado tipo viral **51**

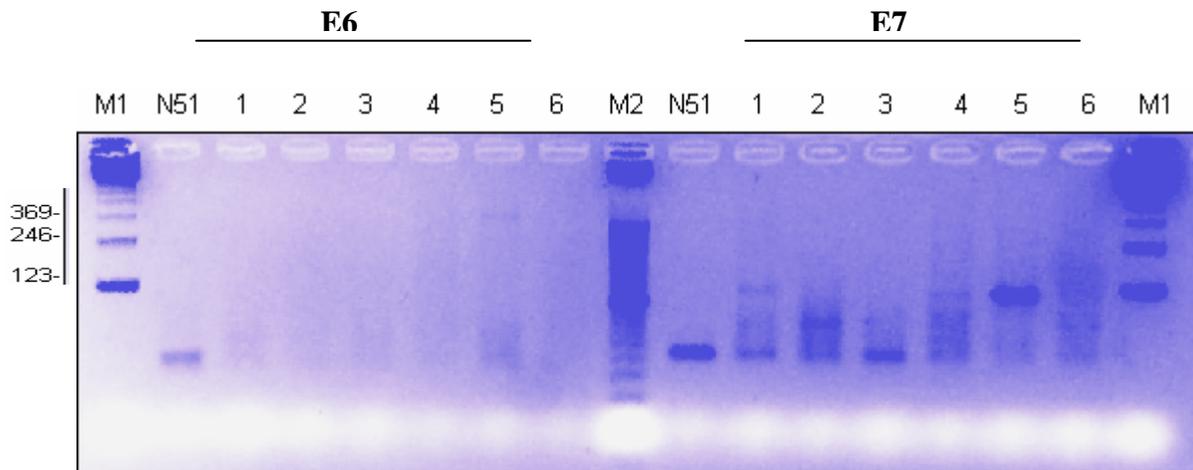
### AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA POR PCR DEL GENOTIPO DE VPH



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo

**Figura.-V** Amplificación con iniciadores específicos de las regiones E6 y E7 para los tipos virales sugeridos 16 y 52 de las muestras (1= H-09, 2= H-1833 y 3= H-6023) La organización es la misma que se señaló en anteriores geles.  
El Resultado **H-09** tipo viral **16** solo la región **E7**  
**H- 1833** tipo viral **16** solo la región **E7**  
**H- 6023** tipo viral **16**

### AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA POR PCR DEL GENOTIPO DE VPH



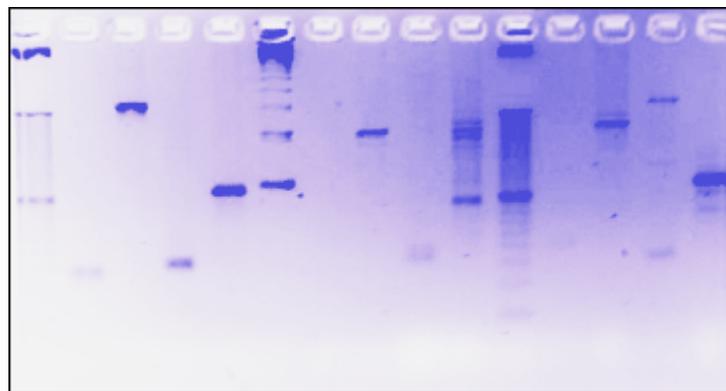
M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo

**Figura.-W** Amplificación con iniciadores específicos de las regiones E6 y E7 para el tipo viral 51 de las muestras (1= H-1967, 2= H-6023, 3= H-6209, 4= H-2927, 5= H-3012 y 6 = H-3350) La organización es la misma que se señaló en anteriores geles. El Resultado Tipo viral 51 H-1967, H-2927 Solo amplificó la región E7 y H-3012 tipo viral 51 ambas regiones

### AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA POR PCR DEL GENOTIPO DE VPH

E6    E7    E6    E7    E6    E7

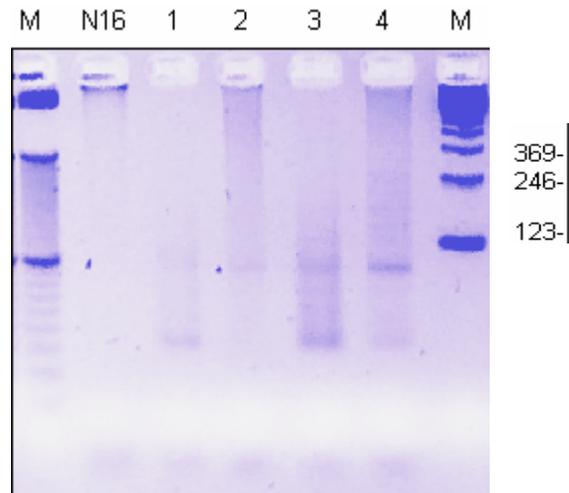
M2 N 16 N 16    M1 N 11    N 6-11    M2 N 30 N 30



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo

**Figura.-X** Amplificación con iniciadores específicos de las regiones E6 y E7 para los tipos virales 16 y 11 de la muestra ( H-4033) y 30 de la muestra (H-857) La organización es la misma que se señalo en los otros geles El Resultado tipo viral 11 Y 16 para H-4033 y el tipo viral 30 para H-857

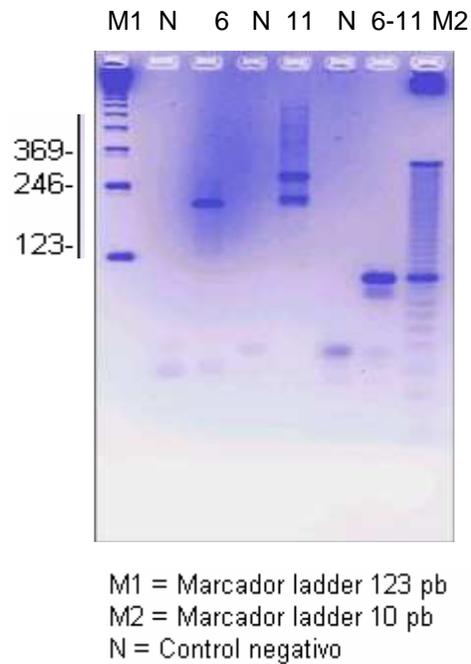
### AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA DE LA REGIÓN E7 POR PCR DEL GENOTIPO DE VPH



M1 = Marcador ladder 123 pb  
M2 = Marcador ladder 10 pb  
N = Control negativo

**Figura. Y** Amplificación con iniciadores específicos de la region E7 para el tipo viral 16 de las muestras 1= H-850, 2= H-5722, 3= H-5761, 4= H-6117 La organización es la misma que se señalo en los otros geles El Resultado tipo viral 16 para todas la muestras aunque son amplificados tenues.

### AMPLIFICACIÓN ESPECÍFICA POR PCR DEL GENOTIPO DE VPH



**Figura. Z** Amplificación con iniciadores específicos de las regiones E6 y E7 para los tipos virales **6 y 11** de la muestra ( **H-436**) La organización es la misma que se señaló en los otros geles El Resultado tipo viral **6 y 11** para **H-436**



## **VII. . Discusión**

Respecto a la detección de VPH, amplificando la región L1, se logro obtener un resultado en 51 muestras que corresponden al (35.7%) de un total de 143, los casos se seleccionaron por el diagnostico histopatológico que permite diferenciar los estratos del epitelio cervical, detectando así el nivel de infiltración de las células infectadas o malignas así como áreas de invasión que se clasifica en distintos grados de Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC). La sensibilidad es muy variable y va desde 40% hasta 89% por la experiencia del interobservador, el grado de inflamación, el cambio de epitelio plano a cilíndrico llamado metaplasma, infecciones por otros virus como el herpes II, bacterias, etc. que producen o dan la apariencia de daño celular y hace que confunda con alguna alteración que sugiera los cambios compatibles con VPH. Esto podría ser un motivo por el cual, en nuestro estudio un numero bajo de muestras se logro detectar el VPH. Cabe señalar que el control interno utilizado amplificó en todas las muestras procesadas (143/143).

La carga viral presente en la muestra puede influir de manera significativa en la amplificación del VPH aun más en el caso de muestras con resultado histológico de NIC I.

Respecto al genotipo de VPH se logro obtener en (39/51) muestras detectadas a VPH. Solo en 6 muestras no se consiguió obtener el tipo viral presente, las posibles causas, que estuvieran presentes otros tipos virales distintos a los 11 con los que se trabajo, o el bajo número de copias del virus; ya que se requiere 14,000 copias aproximadamente para una buena amplificación, esto debido a que se emplean un pool de iniciadores y esto implica un incremento en el DNA.

De las 39 muestras el tipo viral más frecuente fue el VPH-16, seguido del VPH-51, el tipo viral 16 prevaleció en todas las clasificaciones de neoplasia (NIC I, NICII y NICIII) esto es común observarlo, cuando ya existe daño celular moderado o alto pero no en una neoplasia intraepitelial leve NIC I, ya que a nivel mundial se acepta



que siempre este tipo de lesiones están relacionadas con los tipos virales de bajo riesgo. Esta relación no es estricta como se puede constatar en nuestro estudio.

También se encontró que en NIC III y/o Carcinoma solo prevalecen los tipos virales de alto riesgo, en nuestro caso el VPH-16 y VPH-18, que es similar a lo encontrado en otros estudios y por tal motivo se les designó dentro del grupo de alto riesgo como los más oncogénicos y agresivos con una velocidad de replicación mayor respecto a otros tipos virales. Aunque el tipo viral 18 en baja proporción.

El tipo viral VPH-18 solo se encontró en dos casos y diagnosticados como NIC III, lo que nos sugiere que en México no es prevalente este tipo viral mientras que en Europa y EEUU sí lo es.

El tipo viral VPH-51 fue el segundo más frecuente, y se encontró en mayor proporción en neoplasias clasificadas como NIC I y NIC II, lo cual lo clasificaría en el grupo de mediano riesgo, sin embargo se ve una asociación con el tipo viral VPH-16 en infecciones múltiples, esto incrementaría su función oncogénica.

Otro factor importante es la infección múltiple encontrada en 14 muestras y aun más aquellas en las cuales se encuentran asociados un tipo viral de bajo riesgo con uno de alto riesgo, como es el caso de muestras que se fueron diagnosticadas por histología como NIC I y al realizar el genotipo se encontró una asociación de un tipo viral de alto riesgo generalmente VPH-16. La presencia de genotipos múltiples de VPH tiende a aumentar con la severidad de la enfermedad cervical y el porcentaje de evolución a cáncer cervicouterino.

El porcentaje encontrado respecto al total de las muestras genotipificadas que tienen un tipo viral del grupo de alto riesgo es del 94.8% (37/39) esta relación es similar en muestras procesadas por la técnica de captura de híbridos (digene corporation) presentando el 85% (Datos obtenidos en el Dpto. de Biología Molecular 2006). Lo que nos sugiere que es necesaria la implementación del genotipo del VPH para un mejor control.



Una aproximación con nuestro estudio nos llevaría a realizar la siguiente hipótesis, que en México que los tipos virales más prevalentes son VPH-16 y VPH 51. Aunque para confirmarla se necesitaría realizar un estudio más amplio y agregar otros tipos virales como el 58 que lo reportan como uno de los prevalentes en México y Latinoamérica.

Para verificar y hacer confiable el genotipo que se determina en la PCR múltiple es necesario verificar el resultado mediante la amplificación específica del tipo viral señalado.

La visualización de bandas inespecíficas en los geles se debe primordialmente a la existencia de una variedad de temperaturas de alineamiento y la PCR tuvo que realizarse a distintas temperaturas.

El fracaso en la disminución de la mortalidad por cáncer Cervico uterino en México no solo es debido a la sensibilidad de las pruebas como al PAP y citología, sino una parte importante radica en la cobertura inapropiada de la población en riesgo.

La metodología molecular es importante para realizar el tamizaje de los distintos tipos virales, conocer por las asociaciones o infecciones múltiples para una mejor atención respecto a la prevención, diagnóstico, tratamiento y seguimiento del paciente, usándolas en conjunto con las técnicas habituales

Han sido pocos los trabajos que se han realizado para caracterizar molecularmente al VPH en México y aquellos que puedan predecir la prevalencia del VPH en nuestra población, por lo que se hace necesario identificar ¿Cuál es el tipo de VPH más frecuente hallados en mujeres con displasia o cáncer cervicouterino



## **VIII. Conclusiones**

El método de extracción del QIAamp ultrasens resulta eficiente para la extracción de ácidos nucleicos provenientes de tejido parafinado y para la amplificación de las regiones E6 y E7 en una PCR múltiplex para determinar el genotipo de VPH.

La “calidad” de los productos de amplificación depende directamente de las condiciones en las que se lleva a cabo la PCR. La amplificación de ambas regiones, E6 y E7, son necesarias para la determinación del Genotipo.

Existe una fuerte relación entre NIC III y los tipos virales VPH-16 y VPH-18. Esta relación no es estricta en el caso de NIC I con los tipos virales de bajo riesgo VPH-6 y VPH-11 y NIC II con los tipos virales de alto riesgo.

El tipo viral más frecuente en cáncer cervical y neoplasias intraepitelial es el VPH-16, esta característica esta relacionada con su alta afinidad de sus genes proteínas E6 y E7 a las proteínas celulares encargadas de la reparación del ciclo celular y DNA como P53 y su co-adyuvante Rb.

El tipo viral VPH-18 a pesar que es considerado de alto riesgo y de una prevalencia significativa a nivel mundial en nuestro estudio no lo fue.

El tipo viral VPH-51 es el segundo más frecuente, esto a nivel de NIC I y NIC II con una asociación significativa con el tipo VPH -16

La importancia de realizar un estudio por técnicas de biología molecular radica en la información útil para un mejor control en la prevención, diagnostico, tratamiento y seguimiento del paciente.



## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

1. Burd, E. M. 2003. **Human Papillomavirus and cervical cancer. Clinical Microbiology Reviws; 16 (1):1-17.**
2. Chen TM, Pecoraro G, and Defendi V. Cancer Res. 1993. **Genetic analysis of in vitro progression of human papillomavirus-transfected human cervical cells; 53:1167-1171.**
3. Jastreboff AM, Cymet T2002. **Role of the human papillomavirus in the development of cervical intraepitelial neoplasia and malignancy. Postgrad Med J; 78:225-228.**
4. Saturo Motoyama, Ladinines-Llave C.A, Villanueva Luis S and Takeshi Mauro.2004.**The Role of Human Papilloma Virus in the Molecular Biology of Cervical Carcinogenesis;5 (1):9-199.**
5. Consuegra Mayor C P, Molina Campo D, et al. 2004. **El virus de papiloma humano (HPV), agente viral importante precursor de la mayoría de las displasias o cáncer cervical.Salud Uninoire Barraquilla (Col); 19.3-13.**
6. Cortes, G. E. I. & C. H. Leal, 2001. **Papilomavirus Humano. Biología Molecular y Patogénesis. Revista Salud Pública y Nutrición; 2:1-8.**
7. Doll R, and Peto R. J Nat Cancer Inst. 1981. **The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today; 66:1191-1308.**
8. Leon Cruz, Grettell Y Bosques Diego, Omar De Jesús. 2005. **Infección por el virus del papiloma humano y factores relacionados con la actividad sexual en la génesis del cáncer de cuello uterino. Rev Cubana Obstet Ginecol; 31 (1)ISSN 0138-600X.**
9. Zur Hausen H. 1976. **Condylomata acuminata and human genital cancer. Cancer Res; 36:794**
10. Torroella-Kouri M, S. Morsberger, A. Carrillo , A. Mohar , A. Meneses, M. Ibarra, RW Daniel, AM Ghaffari, G Solorza, and KV Shah. 1998. **HPV prevalence among mexican women with neoplastic and normal cervixes. Gynecol Oncol; 70:115-120.**



11. Berumen J, et al. 2001. **Asian-American Variants of Human Papillomavirus 16 and Risk for Cervical Cancer: a Case-Control Study** . *Journal of the National Cancer Institute*; 93(17): 5
12. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, et al. Nov 2004. **Mechanisms of Human Papillomavirus-Induced Oncogenesis**. *J Virol*; 78:11451-11460.
13. Osvaldo Mateo Spinelli. 2000. Junio de 2000, **HPV, P53 y Apoptosis: una interacción peligrosa**, Conferencia presentada durante el XII Congreso Latinoamericano, I Congreso Boliviano y X Reunión Iberoamericana: Citología realizada en la ciudad de Santa Cruz de la Sierra, Bolivia, 4 al 8. junio de 2000
14. Rocha Z. L [NS]. **Virus causantes de enfermedades Prevalentes, emergentes y re-emergentes en México: Papiloma**. Depto. Biología molecular y biotecnología. Instituto de investigaciones biomédicas UNAM
15. Lörincz A.T. 1996. **Hybrid Capture method for detection of human papillomavirus DNA in clinical specimens**. *Papillomavirus Report*; 7:1-5.
16. Milde-Langosch K, Schreiber C, Becker G, Löning T, and Stegner H-E. 1993. **Human Pathol. Human papillomavirus detection in cervical adenocarcinoma by polymerase chain reaction**; 24:590-594
17. Hidalgo-Martínez Ana C. 2006. **El cáncer cervico-uterino, su impacto en México y el porqué no funciona el programa nacional de detección oportuna**. *Rev Biomed*; 17:81-84.
18. Lyon. 2000 **Agencia Internacional para Investigaciones en Cáncer Internacional Center for Cancer Research (IARC)**. Globocan
19. Salud Pública de México 2002. **Estadísticas de mortalidad en México: Muertes registradas en el 2001**; 44:565-581.
20. Alonso de Ruiz P, Lazcano Ponce E, Hernández Ávila M. 2001. **Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control**. Ed. Panamericana. Pag. 57-64
21. Volker Heilmann, MD and Rolf Kreienberg 2002. **Molecular Biology of Cervical Cancer and Its Precursors**. *Curr Womens Health Rep.*; 2(1):27-33.
22. Álvarez-Salas LM y E López-Bayghen 1995 **Regulación genética de los Papilomavirus humanos genitales**. *Salud Publica Mex*; 37:240-247.



23. Stephen T. Oh, Michelle S. Longworth, and Laimonis A. Laimins 2004. **Roles of the E6 and E7 protein in life cycle of low risk Human Papillomavirus Type 11.** *JVI*; 78(5):2620–2626.
24. Taja-Chayeb L, M, Salas-Garcia, y M. Salcedo-Vargas 1996. **Bases moleculares de la carcinogénesis viral del papiloma y polioma.** *Salud Pública Méx*; 38:47-57.
25. Toledo-Cuevas EM, y A García-Carranca 1996 **La proteína p53 y los oncogenes de papilomavirus humanos en la carcinogénesis del cuello uterino.** *Rev Inv Clin*; 48:59-68.
26. Ho GY, Studentsov Y, et al. Jan 2004. **Natural History of Human Papillomavirus Type 16 Virus-Like Particule Antibodies in Young Women.** *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*; 13:110-116.
27. Suzich JA, Ghim S-J, Palmer-Hill FJ, et al. Dec 1995. **Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas.** *Proc Natl Acad Sci*;92:11553-11557.
28. Thomas KK, Hughes JP, Kuypers, JM, et al. 2000. **Concurrent and Sequential Acquisition of Different Genital Human Papillomavirus Types.** *J Infect Dis*; 182:1097-102.
29. Richart RM, Schiffman M H, Cox JT y col. 1995. **Using HPV test to manage patients with abnormal Pap smears.** *Contemporary OB GYN*; 40(8): 65-88.
30. LG. 1993. **Cervical Pap smear: new directions.** *Cancer*; 71:406-412.
31. The Bethesda System 1988 **Reporting cytologic/vaginal diagnoses.** *Acta Cytol*.1193; 37:115-124.
32. Sherman ME, Schiffman MH, Lorincz AT and col1994. **Toward objective quality assurance in cervical cytopathology: correlation of cytopathologic diagnoses with detection of high risk papilloma virus types.** *Am J Clinic Pathol*; 102:182-187.
33. Hatch KD, Schneider A, Abdel Nnour MW. 1995 **An evaluation of human papillomavirus testing for intermediate-and high-risk types as triage before colposcopy.** *Am J Obstet Gynecol*; 172:1150-1157.
34. Illescas L, Dain N, Dino A. 1996. **Epitelio blanco al ácido acético. El diagnóstico diferencial.** *Colposcopia*; 7:141 (Resumen).



35. Cox JT, Schiffman MH, Winzelberg AJ y col. 1992 **An evaluation of human papillomavirus testing as part of referral to Colposcopy clinics. Obstetrics & Gynecology; 80:389-384.**
36. Sellors Jw, Nieminen P, Vesterinen E. y col. 1990. **Observer variability in the scoring of colpophotographs. Obst Gynecol; 76:1006-1008.**
37. Robertson AJ, Anderson JM, Swanson-Beck J, y col. 1989. **Observer variability in histopathological reporting of cervical biopsy specimens. Clin Pathol; 42:231-238.**
38. Inserto del kit de captura de híbridos. **Digene corporation 2005. Pag 2, 29.**
39. Soto, Y. et al. 1998. **Aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de secuencias de Papillomavirus humano. Rev cubana Med Trop; 50(3):191-198.**
40. [www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-QPCR-protocolos.pdf)
41. Arends MJ, AH Wyllie and CC Bird 1990. **Papillomavirus and human cancer. Human Pathology; 21:686-698.**
42. [http://cancernet.nci.nih.gov/clinpdq/facts\\_span2/600320.html](http://cancernet.nci.nih.gov/clinpdq/facts_span2/600320.html)
43. <http://www.gardasil.com>



## X. GLOSARIO

Coilocitos.	Serie de cambios que han sufrido una célula escamosa maduras (superficiales o intermedias); como la presencia de un halo perinuclear, citoplasma denso y hialino y coloración citoplasmática basófila o eosinófila.
FAM	Fluoróforo que absorbe energía a 492nm y la emite a 515nm
Fluoróforo	Molécula que absorbe energía y pasa a un estado excitado; posteriormente, al volver al estado inicial emite el exceso de energía en forma de fluorescencia.
JOE	Fluoróforo que absorbe energía a 527nm y la emite a 548nm
Melting curve	Curva de desnaturalización del producto. La temperatura de máximo decaimiento de la señal. Es específica para cada producto.
Primer	Oligonucleótido o iniciador (secuencia de nucleótidos)
Quenchers	Moléculas que aceptan la energía de un fluoróforo y la disipan en forma de calor o fluorescencia:
Sistema de captura de híbridos	Prueba de hibridización con señal de amplificación para el virus de papiloma humano
Sybr-green	Fluoróforo específico de DNA bicatenario, se intercala a la doble cadena de DNA, absorbe energía a 497 y la emite a 520nm.
Neoplasia	Crecimiento anormal y descontrolado de un tejido por la multiplicación incontrolada de células. Según el grado de diferenciación de sus células y la capacidad invasiva y metastásica se dividen en benignas y malignas.
Displasia	Alteración precancerosa, en diferentes grados de severidad, que puede regresar o evolucionar.
Displasia cervical	Es la proliferación de células malignas en el cuello del útero.

**XI. ANEXOS****ANEXO II** Relación de Muestras procesadas para la extracción de ácidos nucleicos

<b>No.</b>	<b>Codigo Interno de Muestra</b>	<b>Dx. Histologico</b>	<b>Dx. Molecular</b>
36	H-6031-04	NIC I CONO	NO Detectado
37	H-6055-1-04	NIC II	NO Detectado
38	H-6055-2-04	NIC II	NO Detectado
39	H-6071-04	NIC III	NO Detectado
40	H-6117-04	NIC III	Detectado L1
41	H-6209-04	NIC III carcinoma in situ	Detectado L1
42	H-6337-04	NIC II	Detectado L1
43	H-6338-04	NIC II	Detectado L1
44	H-09-05	NIC II	NO Detectado
45	H-18-05	NIC I	NO Detectado
46	H-61-05	carcinoma in situ	NO Detectado
47	H-160-05	NIC I	NO Detectado
48	H-168-05	NIC I	NO Detectado
49	H-188-05	NIC I	Detectado L1
50	H-217-05	NIC II	NO Detectado
51	H-312-05	NIC III	NO Detectado
52	H-314-05	NIC II	NO Detectado
53	H-326-05	NIC I CONO	NO Detectado
54	H-340-05	NIC II	Detectado L1
55	H-341-05	NIC II	NO Detectado
56	H-418-1-05	NIC I CONO	NO Detectado
57	H-418-2-05	NIC I CONO	NO Detectado
58	H-485-2-05	NIC I	NO Detectado
59	H-485-3-05	NICI	NO Detectado
60	H-589-05	NIC II	NO Detectado
61	H-630-05	NIC II	NO Detectado
62	H-649-1-05	NIC I	NO Detectado
63	H-649-2-05	NIC I	NO Detectado
64	H-720	NIC III	NO Detectado
65	H-721	NIC III	Detectado L1
66	H-745	carcinoma in situ	NO Detectado
67	H-753-1	NIC I	NO Detectado
68	H-753-2	NIC I	NO Detectado
69	H-850-05	NIC I	NO Detectado
70	H-864-05	NIC III	NO Detectado
71	H-1168-05	NIC II	NO Detectado



No.	Codigo Interno de Muestra	Dx. Histologico	Dx. Molecular
72	H-1189-05	NIC I	NO Detectado
73	H-1196-05	NIC II	NO Detectado
74	H-1287-05	NIC II	Detectado L1
75	H-1314-05	NIC III	NO Detectado
76	H-1608-05	NIC II	NO Detectado
77	H-1652-05	CARCINOMA	NO Detectado
78	H-1671-05	NIC I	Detectado L1
79	H-1674-05	NIC I	NO Detectado
80	H-1684-05	NIC I CONO	NO Detectado
81	H-1698-05	CARCINOMA	NO Detectado
82	H-1831-05	NICI	NO Detectado
83	H-1833-05	carcinoma in situ	Detectado L1
84	H-1872-05	NO CLASIF	NO Detectado
85	H-1876-05	NIC I	NO Detectado
86	H-1893-05	carcinoma in situ	Detectado L1
87	H-1967-05	NIC I	Detectado L1
88	H-1995-05	CARCIN EPID	NO Detectado
89	H-2026-05	carcinoma in situ	NO Detectado
90	H-2064-05	NIC I	NO Detectado
91	H-2072-05	BIOP PIEL	Detectado L1
92	H-2075-05	NIC I	NO Detectado
93	H-2129-05	CARCIN EPID	NO Detectado
94	H-2131-05	NIC II	NO Detectado
95	H-2148-1-05	NIC I	NO Detectado
96	H-2148-2-05	NIC I	NO Detectado
97	H-2192-05	CARCIN EPID	NO Detectado
98	H-2350-05	NIC I	NO Detectado
99	H-2366-05	NIC I	NO Detectado
100	H-2399-05	NO CLASIF	NO Detectado
101	H-2459-1-05	carcinoma in situ	NO Detectado
102	H-2459-2-05	carcinoma in situ	NO Detectado
103	H-2500-05	NIC I	NO Detectado
104	H-2513-05	CARCIN EPID	NO Detectado
105	H-2564-1-05	carcinoma in situ	NO Detectado
106	H-2564-2-05	carcinoma in situ	NO Detectado
107	H-2657-05	CARCIN EPID	NO Detectado
108	H-2661-05	NO CLASIF	NO Detectado
109	H-2668-1-05	NIC II	NO Detectado
110	H-2668-2-05	NIC II	NO Detectado
111	H-2668-3-05	NIC II	NO Detectado
112	H-2670-05	NIC II	NO Detectado
113	H-2737-05	NIC II	NO Detectado
114	H-2764-05	NIC I	NO Detectado



No.	Codigo Interno de Muestra	Dx. Histologico	Dx. Molecular
115	H-2864-05	BIOP VULVAR	NO Detectado
116	H-2927-05	NIC I	Detectado L1
117	H-2929-05		NO Detectado
118	H-2955-05	Condiloma acumina	NO Detectado
119	H-3012-05	NIC I	Detectado L1
120	H-3072-05	NIC II	Detectado L1
121	H-3225-05	NIC II	Detectado L1
122	H-3226-05	NIC II	NO Detectado
123	H-3271-05	Condiloma acumina	NO Detectado
124	H3272-05	Condiloma acumina	NO Detectado
125	H-3274-05	NIC I	NO Detectado
126	H-3286-05	NIC II	NO Detectado
127	H-3350-05	NIC I	Detectado L1
128	H-3354-05	NIC I	NO Detectado
129	H-3424-05	NIC I	NO Detectado
130	H-3545-05	NIC II	NO Detectado
131	H-3548-05	CARCIN EPID	NO Detectado
132	H-3581-05	NIC I	NO Detectado
133	H-3611-05	CARCIN EPID	NO Detectado
134	H-3609-05	NIC II	NO Detectado
135	H-3811-05	NIC I	NO Detectado
136	H-3846-05	Condiloma acumina	NO Detectado
137	H-3868-05	NIC I	NO Detectado
138	H-3892-05	NICI	Detectado L1
139	H-3929-05	Condiloma ordinario	NO Detectado
140	H-4033-05	Condiloma acumina	Detectado L1
141	H-4146-1-05	NIC III Carcin in situ	NO Detectado
142	H-4146-2-05	NIC III Carcin in situ	NO Detectado
143	H-4156-05	NIC III Carcin in situ	NO Detectado



## ANEXO II

Revisión de la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de cada uno de los 11 tipos virales para el diseño de los iniciadores de la Región E6 y la Región E7

### *Tipo 6*

#### **Gen E6 103-555**

##### ***Secuencia de aminoácidos***

MESANASTSATTIDQLCKTFNLSMHTLQINCVFCKNALTTAEIY  
SYAYKQLKVLFRGGYPYAACACCLEFHGKINQYRHFYAGYATTVEEETKQDILDVLI  
RCYLCHKPLCEVEKVKHILTKARFIKLNCTWKGRCLHCWTTMEDMLP

##### ***Secuencia de nucleótidos***

atggaaag tgcaaatgcc 121 tccacgtctg caacgaccat agaccagttg tgcaagacgt ttaatctatc tatgcatagc  
181 ttgcaaatta attgtgtggt tgcaagaat gcactgacca ctgcagagat ttattcatat 241 gcatataaac  
agctaaaggt cctgtttcga ggcggctatc catatgcagc ctgcgcgtgc 301 tgctagaat ttcatggaaa  
aattaaccaa tatagacact tgattatgc tggatatgca 361 acaactgttg aagaagaaac taaacaagac  
atlttagacg tgctaattcg gtgctacctg 421 tgtcacaac cgctgtgtga agtagaaaag gtaaacata  
tactaaccaa ggcacggttc 481 ataaagctaa attgtacgtg gaagggtcgc tgctacact gctggacaac  
atgcatggaa 541 gacatgttac cctaa

#### **Gen E7 531-827**

##### ***Secuencia de aminoácidos***

MHGRHVTLKDIVLDLQPPDPVGLHCYEQLVDSSEDEVDEVDGQD  
SQPLKQHYQIVTCCCGCDSNVRLVVQCTETDIREVQQLLLGTLNIVCPICAPKT

##### ***Secuencia de nucleótidos***

atgcatggaa 541 gacatgttac cctaaaggat attgtattag acctgcaacc tccagaccct gtagggttac 601  
attgctatga gcaattagta gacagctcag aagatgaggt ggacgaagtg gacggacaag 661 attcacaacc  
tttaaaacaa cattaccaa tagtgacctg tigtgtgga tigtgacagca 721 acgttcgact ggtgtgacg  
tgtacagaaa cagacatcag agaagtcaa cagcttctgt 781 tggaacact aaacatagtg tgtccatct  
gacaccgaa gacataa



## Tipo 11

### Gen E6 102-554

#### Secuencia de aminoácidos

MESKDASTATSIDQLCKTFNLSLHTLQIQCVFCRNALTTAEIY  
AYAYKNLKVWRDNFPFAACACCLELQGKINQYRHFNYAAYAPTVEEETNEDILKVL  
RCYLCHKPLCEIEKLKHLGKARFIKLNQWKGRCLHCWTTMEDLLP

#### Secuencia de nucleótidos

atggaaagt aaagatgctt 121 ccacgtctgc aacatctata gaccagtgtg gcaagacgtt taatcttct ttgcacactc  
181 tgcaaaatca gtgcgtgtt tgcaggaatg cactgaccac cgcagagata tatgcatatg 241 cctataagaa  
cctaaagggt gtgtggcgag acaactttcc cttgacgagc tgtgcctgtt 301 gcttagaact gcaagggaaa  
attaaccaat atagacactt taattatgct gcatatgcac 361 ctacagtaga agaagaaacc aatgaagata  
ttttaaagt gtaattcgt tttacctgt 421 gtcacaagcc gttgtgtgaa atagaaaaac taaagcacat attgggaaag  
gcacgctca 481 taaaactaaa taaccagtgg aagggtcgtt gcttacctg ctggacaaca tgcattgaa 541  
actgttacc ctaa

### Gen E7 530-826

#### Secuencia de aminoácidos

MHGRLVTLKDIVLDLQPPDPVGLHCYEQLEDSSSEDEVKVDKQD  
AQPLTQHYQILTCCCGCDSNVRLVVECTDGDIRQLQDLLLGLNIVCPICAPKP

#### Secuencia de nucleótidos

a tgcattgaaag 541 actgttacc ctaaaggata tagtactaga cctgcagcct cctgaccctg tagggttaca 601  
ttgctatgag caattagaag acagctcaga agatgagggtg gacaagggtg acaacaaga 661 cgcacaacct  
ttaacacaac attaccaaat actgacctgt tgcgtgtgat gtgacagcaa 721 cgtccgactg gttgtggagt  
gcacagacgg agacatcaga caactacaag accttttct 781 gggcacacta aatattgtgt gtccatctg  
cgacacaaaa cctaaa

## Tipo 16

### Gen E6 83-559

#### Secuencia de aminoácidos

MHQKRTAMFQDPQERPRKLPQLCTELQTTIHDIILECVYCKQQL  
LRREVYDFAFRDLCIVYRDGNPYAVCDKCLKFYKISEYRHYCYSLYGTTLEQQYNKPLCDL  
LIRCINCQKPLCPEEKQRHLDKQRFHNIRGRWTGRCMSSCRSSRTRETQL

#### Secuencia de nucleótidos

atgcacca aaagagaact gcaatgtttc aggaccaca 121 ggagcgacc agaaagttac cacagttatg  
cacagagctg caacaacta tacatgatat 181 aatattagaa tgtgtgtact gcaagcaaca gttactgca  
cgtgaggtat atgactttgc 241 ttttcgggat ttatgcatag tatatagaga tgggaatcca tatgctgat gtgataaatg  
301 tttaaagttt tattctaaaa ttagtgagta tagacattat tttatagtt tttatggaac 361 aacattagaa



cagcaataca acaaaccgtt gtgtgattg ttaattaggt gtattaactg 421 tcaaaagcca ctgtgtcctg  
aagaaaagca aagacatctg gacaaaaagc aaagattcca 481 taatataagg ggtcgggtga ccggtcgatg  
tatgtctgt tgcagatcat caagaa**cacg 541 tagagaaacc cagctg**taa

#### Gen E7: 562-858

##### Secuencia de aminoácidos

MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDGPAGQ  
AEPDRAHYNIVTFCKCDSTLRLCVQSTHVDIRTLEDLLMGTGLGIVCPICSQKP

##### Secuencia de nucleótidos

atgcatgga gatacaccta cattgcatga atatatgta 601 gatttgaac cagagacaac tgatctctac tgttatgagc  
aattaaatga **cagctcagag 661 gaggaggatg** aatatagatg tccagctgga caagcagaac cggacagagc  
ccattacaat 721 attgtaacct tttgt**gcaa gtgtgactct acgct**tcggt tgtgcgtaca aagcacacac 781  
gtagacattc gtactttgga agacctgta atgggcacac taggaattgt gtgccccatc 841 tgttctcaga aaccataa

#### Tipo 18'

#### Gen E6 105-581

##### Secuencia de aminoácidos

MARFEDPTRRPYKLPDLCTELNTSLQDIEITCVYCKTVLELTV  
FEFAFKDLFVYRDSIPHAACHKCIDFYSRIRELRHYSDSVYGDLEKLTNTGLYNLLIRCLRC  
QKPLNPAEKLRHLNEKRRFHNIAGHYRGQCHSCCNRRARQERLQRRRETQV

##### Secuencia de nucleótidos

atggcg cgctttgagg 121 atccaacacg gcgaccctac aagctacctg atctgtgcac ggaactgaac  
acttactgc 181 aagacataga aa**taacctgt gtatattgca ag**acagtatt ggaactaca gaggtattg  
241 aatttgcat taaagattta tttgtggtgt atagagacag tatacccat gctgcatgcc 301 ataatgtat  
agattttat tctagaatta gagaattaag acattattca gactctgtgt 361 atggagacac attggaaaa  
ctaactaaca ctgggtata caattata ataagtgcc 421 tgcggtgcca gaaaccgtg aatccagcag  
aaaaactag acacctaat gaaaaacgac 481 gattcaca catagctggg cactatagag  
gccagtgcca ttcgtgctgc aaccgagcac 541 gacaggaacg actccaac**ga cg**cagagaaa  
**cacaag**tata a

#### Gen E7 590-907

##### Secuencia de aminoácidos

MHGPKATLQDIVLHLEPQNEIPVDLLCHEQLSDSEEENDEIDGV  
NHQHLPARRAEPQRHTMLCMCKCEARIELVVESSADDLRAFQQLFLNTLSFVCPWCA  
SQQ



### Secuencia de nucleótidos

a tgcattgacc 601 taaggcaaca ttgcaagaca ttgtattgca tttagagccc caaaatgaaa ttccggttga 661  
ccttctatgt cactgagcaat taagcgactc agaggaagaa aacgatgaaa tagatggagt 721 taatcatcaa  
cattaccag cccgacgagc cgaaccacaa cgtcacacaa tgttgtgtat 781 gtgtgtaag tgtgaagcca  
gaattgagct agtagtagaa agctcagcag acgacctcg 841 agcattccag cagctgttc tgaacacct  
gtcctttgtg tgccgtgtg gtgcatcca 901 gcaataa

### Tipo 30

#### Gen E6: 102-563

### Secuencia de aminoácidos

MAFKFENTGERPRTVHHLCEVQETSLLLELQLQCVYCKKELSSSE  
VYNFACKDLRLVYREDSFYAVCNFCLLFYSKVRKIRHYNYSLYGASLVALTKKELFDLLIRCY  
RCQQPLTPEEKQLHCEYKKRFHRISRTWTGLCLQCWRHTTSTETAV

### Secuencia de nucleótidos

atggcttc aaattgaaa 121 atacaggcga ggcgccactg actgtgcacc atctttgtga ggtacaagaa  
acatcgttgc 181 tggagctaca gctacagtgt gtatattgca agaaggaatt atccagctca gaggtatata 241  
atcttgcag taaagattta agactggtat atagggagga cagccatat gcagtgtgca 301 atctctgttt attatttat  
agtaaagtaa gaaagattag acattacaac tattcattgt 361 atggggcaag cctagtggca ttaactaaaa  
aagagttatt tgattatta ataaggtgct 421 acagatgtca acagccgttg acaccagagg aaaaacagtt  
aactgtgaa tataagaaac 481 ggttcacag aatatcacgt acgtggaccg gggtatgtct gcaatgctgg  
agacacacaa 541 cgtccactga gacagcagta taa

#### Gen E7 566-883

### Secuencia de aminoácidos

MHGKVTTIPEYILDLPQTEIDLHCYEQLNSSEEEDEDEVDNLQ  
KQPQQARQEEQHPCYLINTQCCRCASAVQLAVQSPTKELRALQQMLMGALELVCPLCA  
TRR

### Secuencia de nucleótidos

atgca cggtaaagta acaactattc cagaatatat 601 ttggacctt gtaccgcaaa ctgaaattga cctgcattgc  
tatgagcaat tgaacagctc 661 agaggaagag gatgaggatg aagtagacaa tttacagaag cagccacagc  
aagctagaca 721 agaagaacaa catcctgtt acctaatata cacacagtgt tgtagggtgt cgtctgcggt 781  
gcagttggct gttcagagtc ccacaaagga gctgcgtgcc ctacaacaga tgcttatggg 841 cgactggag  
ctagtgtgc cctgtgtgc aacaaggcgg taa



**Tipo 31:**

**Gen E6 108-557**

**Secuencia de aminoácidos**

MFKNPAERPRKLHELSSALEIPYDELRLNCVYCKGQLTETEVL  
FAFTDLTIVYRDDTPHGVCTKCLRFYSKVFSEFRWYRYSVYGTTLEKLTNKGICDLLIR  
CITCQRPLCPPEEKQRHLDKKRHFHNIGRWTGRCIACWRRPRTETQV

**Secuencia de nucleótidos**

atg tcaaaaatc 121 ctgcagaaag acctcgaaa ttgcatgaac taagctcggc attgaaata cctacgatg 181  
aactaagatt gaattgtgtc tactgcaaa gtcagttaac agaacagag gtattagatt 241 ttgcatttac agatttaaca  
atagtatata gggacgacac accacacgga gtgtgtacaa 301 aatgtttaag atttattca aaagtaagtg  
aathtagatg gtatagatat agtgtgatg 361 gaacaacatt agaaaaattg acaaacaaag gtatatgtga ttgttaatt  
aggtgtataa 421 cgtgtcaaag accgttgtgt ccagaagaaa acaaaagaca ttggataaa aagaaacgat 481  
tccacaacat aggaggaagg tggacaggac gttgcatagc atgttgagaga agacctcgtgta 541 ctgaaaccca  
agtgtaa

**Gen E7 560-856**

**SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS**

MRGETPTLQDYVLDLQPEATDLHCYEQLPDSSDEEDVIDSPAGQ  
AEPDTSNYNIVTFCCQCKSTLRLCVQSTQVDIRILQELLMGSFGIVCPNCSTRL

**Secuencia de nucleótidos**

a tgcgtggaga aacacctacg ttgcaagact atgtgttaga 601 ttgcaacct gaggcaactg acctccactg  
ttatgagcaa ttaccgaca gctcagatga 661 ggaggatgtc atagacagtc cagctggaca agcagaaccg  
gacacatcca attacaatat 721 cgttacctt ttgtgtcagt gtaagtctac acttcgttg tgtgtacaga gcacacaagt  
781 agatattcgc atattgcaag agctgttaat gggctcatt ggaatcgtgt gccccactg 841 ttctactaga ctgtaa

**Tipo 33:**

**Gen E6 109-558**

**Secuencia de aminoácidos**

MFQDTEEKPRTLHDLQALETTIHNIELQCVECKKPLQRSEVYD  
FAFADLTVVYREGNPFQICKLCLRFLSKISEYRHYNSVYGNTLEQTVKKPLNEILIR  
CIICQRPLCPQEKKRHVDLNKRFHNISGRWAGRCAACWRSRRRETAL

**Secuencia de nucleótidos**

at gttcaagac 121 actgaggaaa aaccacgaac attgcatgat ttgtgccaag cattggagac aactatacac 181  
aacattgaac tacagtgcgt ggaatgcaaa aaaccttgc aacgatctga ggtatatgat 241 ttgcatttg cagatttaac  
agttgtatat agagagggaa atccatttg aatatgaaa 301 ctgtgttgc ggttctatc taaaattagt gaatatagac  
attataatta ttctgtatat 361 ggaaatacat tagaacaac agttaaaaaa ctttaaatg aaatattaat taggtgtatt  
421 atatgtcaaa gaccttgg tctcaagaa aaaaaacgac atgtggatt aaacaaacga 481 ttccataata  
ttcgggtcgt ttggcaggg cgctgtcgg cggtgtggag gtcccacgtgta 541 agagaaactg cactgtga



**Gen E7 573-866**

**Secuencia de aminoácidos**

MRGHKPTLKEYVLDLYPEPTDLYCYEQLSDSSDEDEGLDRPDGQ  
AQPATADYYIVTCCHTCNTTVRLCVNSTASDLRTIQQLLMGTVNIVCPTCAQQ

**Secuencia de nucleótidos**

atgagagg acacaagcca acgttaaagg 601 aatatgtttt agatttatat cctgaaccaa ctgacctata ctgctatgag  
caattaagtg 661 acagctcaga tgaggatgaa ggcttgacc ggccagatgg acaagcaca ccagccacag 721  
ctgattacta cattgtaacc tgtgtcaca ctgtaacac cacagttcgt ttatgtgtca 781 acagtacagc aagtaccta  
cgaaccatac agcaactact tatgggcaca gtgaatattg 841 tgtgcctac ctgtgcacaa caataa

**Tipo 35:**

**Gen E6 110- 559**

**Secuencia de aminoácidos**

MFQDPAERPYPYKLHDLCLNEVEESIHEICLNCVYCKQELQRSEVYD  
FACYDLCIVYREGQPYGVCMKCLKFYSKISEYRWYRYSVYGETLEKQCNCQLCHLLIR  
CITCQKPLCPVEKQRHLEEKRFHNIGGRWTGRCMSCWKPTRRETEV"

**Secuencia de nucleótidos**

a tgttcagga 121 ccagctgaa cgacctaca aactgcatga tttgtgcaac gaggtagaag aaagcatcca 181  
tgaattgtg tgaattgtg tatactgcaa acaagaatta cagcggatg aggtatatga 241 cttgcatgc tatgattgt  
gtatagtata tagagaaggc cagccatag gatgatgat 301 gaaatgtta aaattttatt caaaaataag  
tgaatataga tggatagat atagtgtga 361 tggagaaac ttagaaaaac aatgcaaca acagttatg  
catttattaa ttagggtgat 421 tacatgtcaa aaaccgctgt gtccagtga aaagcaaga catttagaag  
aaaaaaaaacg 481 attccataac atcgggtggac ggtggacagg tcggtgatg tctgttggga aaccaa **cacg 541**  
**tagagaaacc gaggtg**taa

**Gen E7 562-861**

**Secuencia de aminoácidos**

MHGEITTLQDYVLDLEPEATDLYCYEQLCDSSEEEEDTIDGPAG  
QAKPDTSNYNIVTSCCKCEATRLRCVQSTHIDIRKLEDLLMGTFGIVCPGCSQRA

**Secuencia de nucleótidos**

atgcatgga gaaataacta cattgcaaga ctatgtttta 601 gatttggac ccgaggcaac tgacctatac tgttatgagc  
aattgtgtga **cagctcagag 661 gaggaggaag** atactattga cggccagct ggacaagcaa aaccagacac  
ctccaattat 721 aatattgtaa cgtccigtg **taaatgtgag gcgac**actac gtctgtgtgt acagagcaca 781  
cacattgaca tacgtaaatt ggaagattta ttaatggca catttggat agtgtgcccc 841 ggctgtcac  
agagagcata a



**Tipo 45: Gen E6 102-578**

**Secuencia de aminoácidos**

MARFDDPKQRPYKLPDLCTELNTSLQDVSIACVYCKATLERTEV  
YQFAFKDLCIVYRDICAIYAACHKCIDFYSRIRELRYYSNSVYGETLEKITNTELYNLLIRCLRC  
QKPLNPAEKRRHLKDKRRFHSIAGQYRGQCNTCCDQARQERLRRRRETQV

**Secuencia de nucleótidos**

atggcgcgc tttgacgatc 121 caagcaacg acctacaag ctaccagatt tgtgcacaga attgaataca  
tcactacaag 181 acgtatctat **tgctgtgta tattgcaaag** caacattgga acgcacagag gtatatcaat 241  
ttgcttttaa agatttatgt atagtgtata gagactgtat agcatatgct gcatgccata 301 aatgtataga cttttattcc  
agaattagag aattaagata ttattcaaac tctgtatatg 361 gagagacact ggaaaaaata actaatacag  
agttgtataa tttgtaata aggtgcctgc 421 ggtccagaa accattgaac ccagcagaaa aacgtagaca  
ccttaaggac aaacgaagat 481 ttacagcat agctggacag taccgagggc agtgaatac atgtgtgac  
caggcacggc 541 aagaaagact **tcgcagacgt agggaaacac aagtatag**

**Gen E7 587-907**

**Secuencia de aminoácidos**

MHGPRETLQEIVLHLEPQNELDPVDLLCYEQLSESEEEENDEADG  
VSHAQLPARRAEPQRHKILCVCKCDGRIELTVESSAEDLRTLQQLFLSTLSFVCPWC  
ATNQ

**Secuencia de nucleótidos**

atgc atggaccccg 601 ggaaacactg caagaaattg tattgcattt ggaacctcag aatgaattag atcctgttga 661  
cctgttgtgt tacgagcaat ta**agcgagtc agaggaggaa aacgatgaag** cagatggagt 721 tagtcatgca  
caactaccag cccgacgagc cgaaccacag cgtcacaana tttgtgtgt 781 a**tggtgtaag tgtgacggca**  
**gaattgagct** tacagtagag agctcggcag aggacctag 841 aactacag cagctgtttt tgagcacctt  
gtcctttgtg tgtccgtggt gtgcaactaa 901 ccaataa

**Tipo 51**

**Gen E6 97-552**

**Secuencia de aminoácidos**

MFEDKRERPRTLHELCEALNVSMHNIQVVCVYCKKELCRADVYN  
VAFTEIKIVYRDNNPYAVCKQCLLFYSKIREYRRYSRSVYGTTLEAITKKSLYDLSIR  
CHRCQRPLGPEEKQKLVDEKRFHEIAGRWTGQCANCWQRTRQRNETQV

**Secuencia de nucleótidos**

atgt tcgaagacaa gagggaaaga 121 ccacgaacgc tgcattgaatt atgtgaagct ttgaacgttt ctatgcacaa  
tatacaggt**a 181 gttgtgtgt attgtaaaa** ggaattatgt agagcagatg tatataatgt agcatttact 241  
gaaattaaga ttgtatatag ggataataat ccatatgcag tatgcaaca atgtttactg 301 ttttattcaa aaattagaga  
gtatagacgt tatagcaggt ctgtgtatgg tactacatta 361 gaggaatta ctaaaaaaag ctatattgat ttatcgataa  
ggtgtcatag atgtcaaaga 421 ccacttgggc ctgaagaaaa gcaaaaattg gtggacgaaa aaaaaagggt  
ccatgaaata 481 gcgggacgtt ggacggggca atgcgctaatt tgctggcaac gtacacgaca **acgtaacgaa 541**  
**accgaagt** aa



## Gen E7 560-865

### Secuencia de aminoácidos

MRGNVPQLKDVVLHLPQTEIDLQCYEQFDSSEEEDEVNMRDQ  
LPERRAGQATCYRIEAPCCRCSSVVQLAVESSGDTLRVVQQMLMGELSLVCPCCANN

### Secuencia de nucleótidos

a tgcgtgtaa tgtaccacaa ttaaagatg tagtattgca 601 tttacacca cagactgaaa tgacttgca  
atgctacgag caattgaca gctcagagga 661 ggaggatgaa gtagataata tgcgtgacca gctaccagaa  
agacgggctg gacaggctac 721 gtgtacaga attgaagctc cgtgttcag gtttcaagt gtagtacaac  
tggcagtgga 781 aagcagtgga gacaccctc gcgtgtaca gcagatgta atgggcgaac taagcctggt 841  
ttgccctgt tgtgcaaca actag

## Tipo 52

### Gen E6 102-548

### Secuencia de aminoácidos

MFEDPATRPRTLHELCEVLEESVHEIRLQCVQCKKELQRREVK  
FLFTDLRIVYRDNNPYGVCIMCLRFLSKISEYRHYQYSLYGKTLLEERVKKPLSEITIR  
CIICQTPLCPEEKERHVNANKRFHNIMGRWTGRCSECWRPRPVTQV

### Secuencia de nucleótidos

atgttgag gatccagcaa 121 cagaccccg gaccctgcac gaattgtg agtgctgga agaactggtg  
catgaaataa 181 ggctgcagtg tgtgcagtgc aaaaaagagc tacaacgaag agaggatac aagtttctat 241  
ttacagatt acgaatagta tatagagaca ataaccata tggcgtgtg attatgtgcc 301 tacgctttt atctaagata  
agtgaatata ggcattatca atattcactg tatgggaaaa 361 cattagaaga gagggtaaaa aaaccattaa  
gtgaaataac tattagatgt ataattgtc 421 aaacgccatt atgtcctgaa gaaaagaaa gacatgtaa  
tgcaacaag cgattcata 481 atattatggg tcgttgaca gggcgctgt cagagtgtg gagacccga  
cctgtgacc 541 aagttaa

## Gen E7 553-852

### Secuencia de aminoácidos

MRGDKATIKDYILDLPETDLHCYEQLGDSSDEEDTDGVDRPD  
GQAEQATSNYYIVTYCHSCDSTLRLCIHSTATDLRRTLQQMLLGLTQVVCPGCARL

### Secuencia de nucleótidos

atgctgag agacaaagca actataaag attatatatt agatctgcaa 601 cctgaaacaa ctgacctaca  
ctgctatgag caattagtg acagctcaga tgaggaggat 661 acagatggtg tggaccggcc agatggacaa  
gcagaacaag ccacaagcaa ttactacatt 721 gtgacatatt gtcacagtg tgatagacaa ctaccgctat  
gcattcatag cactgcgacg 781 gacctcgtc ctctacagca aatgctgtg ggcacattac aagtgtgtg  
ccccgctgt 841 gcacggctat aa