

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



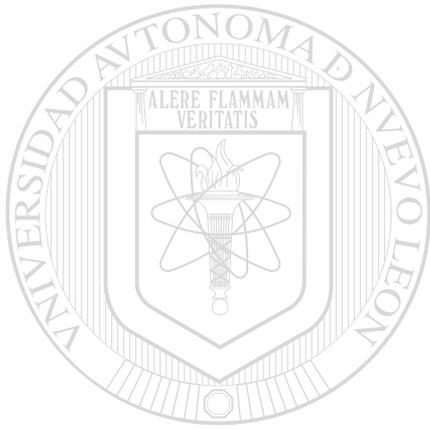
ANALISIS MOLECULAR DE LOS FACTORES
EXTRINSECOS E INTRINSECOS ASOCIADOS
A CANCER CERVICO-UTERINO

POR:

Q.C.B., M.C. SANDRA GUADALUPE MARTINEZ G.

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

Diciembre, 2002



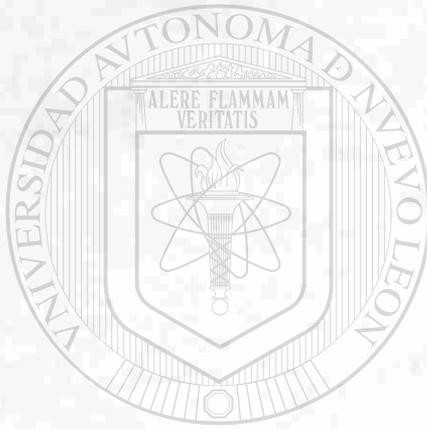
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Q.C.B., M.C. SANDRA GUADALUPE MARTINEZ G.

TD
RC280
.U8
M3
c.1



1080116991



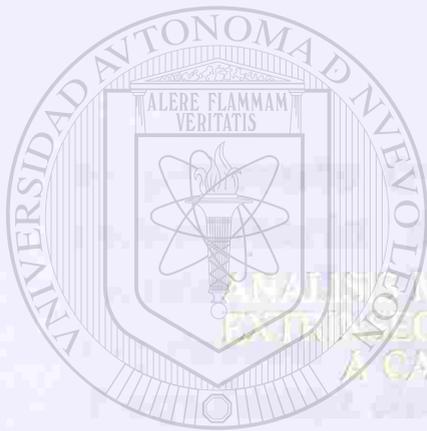
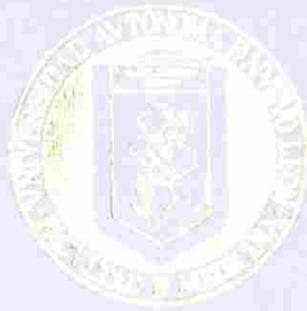
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS FACTORES
EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS ASOCIADOS
A CÁNCER CERVICOUTERINO

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

POR:

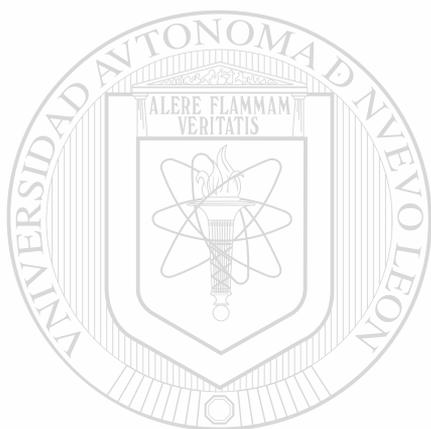
DR. C.B. M.C. SANDRA GUADALUPE MARTÍNEZ G.

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

Diciembre, 2002



TD
RC280
.U8
M3



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular de la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la asesoría de la Dra. Rocío Ortiz López y la coasesoría del Dr. Hugo Alberto Barrera Saldaña.

ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS ASOCIADOS A CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

Aprobación de la Tesis:



DRA ROCIO ORTIZ LOPEZ
Director de Tesis



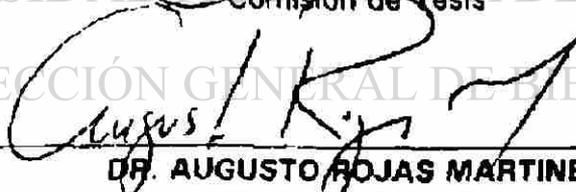
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Co-Director de Tesis



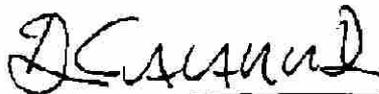
DRA. HERMINIA G. MARTINEZ RODRIGUEZ
Comisión de Tesis



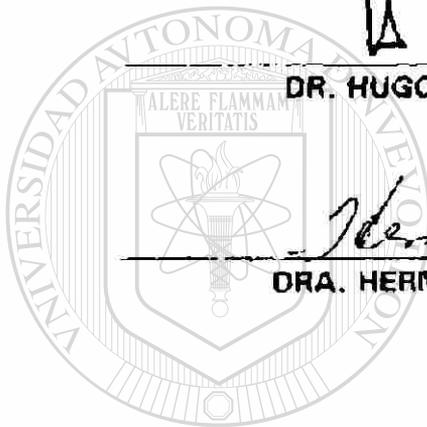
DRA. AGNÉS REVOL DE MENDOZA
Comisión de Tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Comisión de Tesis



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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



AGRADECIMIENTOS

A todas las **"PACIENTES"** que aceptaron participar en el estudio y contribuyeron para el desarrollo de esta tesis.

A las personas que de una u otra manera colaboraron para hacer posible la realización de esta tesis, en orden alfabético:

Dra. Oralia Barbosa Quintana

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

Dr. Ricardo M. Cerda Flores

Dr. Iván Delgado Enciso

Dr. Juan P. Flores Gutiérrez

Dr. José G. Garza Leal

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez

Dra. Rocío Ortiz López

Dra. Agnès Revol de Mendoza

Dr. Augusto Rojas Martínez

Dr. Oscar Vidal Gutiérrez

A todos los integrantes del Departamento de Ginecología y Obstetricia y del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario "José E. González", de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo al proyecto y por la beca que me otorgó.

A mis **"AMIGOS"** por darme su amistad y colaboración durante mis años de estancia en la U.L.I.E.G.

A mis **"NUEVOS AMIGOS"** que me han aceptado y me han ayudado a salir adelante en la nueva etapa de mi vida.

Al **Dr. Antonio M. Gutiérrez Gutiérrez** por confiar en mi.

A **Claudia, Victor y Andy** por aceptarme como de su familia.

A mi **"FAMILIA"** (Mamá, Papá, Gordo y Miriam) por acompañarme y apoyarme siempre en todo momento.

A **Julián** por darme la oportunidad de conocerlo.

A **Dios** por estar siempre a mi lado.

RESUMEN

Facultad de Medicina de la U.A.N.L.

Q.C.B., M.C. Sandra Gpe. Martínez Garza

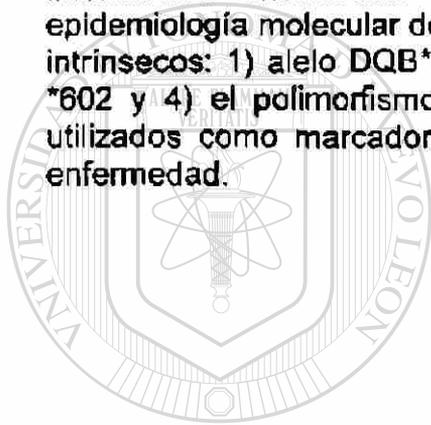
**Título del Estudio: ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS FACTORES
EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS ASOCIADOS
A CÁNCER CÉRVICO-UTERINO.**

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

Área de Estudio: Medicina Molecular.

Objetivo y Método de Estudio: Dentro de las enfermedades neoplásicas, el Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU), es uno de los problemas prioritarios en salud pública del mundo. En los países latinoamericanos y en particular en México, el problema es aún más acentuado, pues es la primera causa de muerte por cáncer en mujeres con una tasa de mortalidad de 15/100,000 habitantes, lo que ubica a México como uno de los países con más alta tasa de mortalidad por esta causa en el mundo. El virus del papiloma humano (HPV), considerado como un factor extrínseco, ha sido asociado al CaCU como una causa necesaria, aunque no suficiente para el desarrollo de la enfermedad. Entre las evidencias que indican que algunos HPV están involucrados tenemos: 1) El DNA viral se encuentra en >90% de dichos tumores (más frecuentemente el DNA del HPV tipo 16), 2) El DNA del HPV se integra al genoma celular, 3) Los oncogenes de los HPVs de alto riesgo inmortalizan cultivos primarios de queratinocitos humanos con la cooperación del oncogen ras, 4) El aumento de la expresión de las oncoproteínas virales E6 y E7. Mientras que entre los factores intrínsecos de las pacientes cuya función es mediar la infección del virus, destacan: haplotipos del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA), la predisposición genética a CaCU conferida por el polimorfismo en el codón 72 en la proteína tumor-supresora p53 y las mutaciones en los oncogenes Ras. Considerando que el CaCU es debido a diversos factores, el objetivo de este estudio fue determinar la posible asociación de CaCU con: 1) Factores extrínsecos (tipos de HPVs, integración del HPV 16 y número de copias del HPV 16), 2) Factores intrínsecos (HLA, polimorfismo en el gen p53 y mutaciones en los oncogenes K y H-ras) en mujeres con y sin CaCU. La investigación incluyó un aspecto de tipo clínico y uno experimental. En el primero se obtuvo la información clínico-patológica de 185 pacientes (85 casos y 100 controles) en una entrevista con los pacientes, aplicación de un cuestionario y análisis del estudio de patología. La parte experimental incluyó: 1) El establecimiento de un banco de DNA a partir de muestras de tejido fresco y sangre, 2) Implementación de las técnicas para la detección de 27 tipos de HPV, 3) Implementación de las técnicas para conocer el estado de integración y el número de copias de HPV 16, 4) Determinación de los alelos DQA, 5) Implementación de las técnicas para determinar los alelos DQB, DR3, DR4 y el polimorfismo en el codón 72 del gen p53, 5) Determinación de las mutaciones presentes en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras y el codón 12 del oncogen H-ras y 6) Asociación de los datos clínico-patológicos con cada uno de los

factores analizados en las mujeres con CaCU vs mujeres sin CaCU. **Contribuciones y Conclusiones:** Nuestros resultados confirman una alta asociación entre HPV y CaCU. Sin embargo no encontramos asociación entre el estado de integración y el número de copias de HPV 16 y CaCU. Observamos que en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad, el alelo DQB*0602 y el haplotipo DQA-DQB*4*0602 actúan como factores protectores mientras que el alelo DQB*0201 actúa como factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en la población mexicana. El polimorfismo Arg/Arg previamente relacionado con CaCU en otras poblaciones, no mostró diferencia significativa entre ambos grupos. Sin embargo, en nuestra población el polimorfismo Pro/Pro del codón 72 del gen p53 es un factor de riesgo en las pacientes HPV-16 positivas de padecer CaCU de células escamosas. En cuanto a los oncogenes ras los cuales han sido asociados a diferentes cánceres, en nuestro estudio, la frecuencia de mutaciones en el codón 12 del oncogen H-ras en CaCU es de 12% y del oncogen K-ras es de 3.5%. La información encontrada en este estudio aporta datos importantes a la epidemiología molecular del CaCU en nuestro país, además de que los factores intrínsecos: 1) alelo DQB*0201, 2) alelo DQB*0602, 3) haplotipo DQA-DQB*4*0602 y 4) el polimorfismo Pro/Pro del codón 72 del gen p53, pudieran ser utilizados como marcadores moleculares predictivos para el desarrollo de la enfermedad.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIRMA DEL ASESOR:

Dra. Rocío Ortiz López

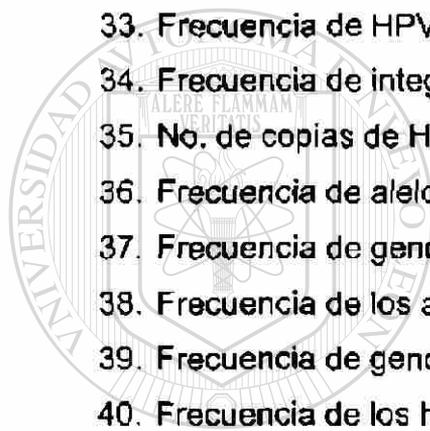
FIRMA DEL CO-ASESOR:

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Historia natural de las neoplasias intraepiteliales cervicales.	8
2. Genes del HPV.	11
3. Tipos de HPVs identificados por el estuche.	38
4. Condiciones de amplificación para la detección de HPVs.	39
5. Condiciones del programa para la amplificación de HPVs.	39
6. Condiciones de reacción para la amplificación del gen E1 de HPV-16.	43
7. Condiciones de reacción para la amplificación del gen E2 de HPV-16.	43
8. Condiciones del programa para la amplificación del gen E2 de HPV-16.	44
9. Condiciones de la reacción para la amplificación del gen E6 de HPV-16.	45
10. Condiciones del programa para la amplificación del gen E6 de HPV-16.	46
11. Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DQA.	48
12. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DQA.	48
13. Secuencia de primers usados para determinar los alelos HLA-DQB.	50
14. Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DQB.	51
15. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DQB.	51
16. PCRs utilizadas para la identificación de los alelos HLA-DQB.	52
17. Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DR3.	54
18. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DR3.	54
19. Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DR4.	55
20. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DR4.	55
21. Condiciones de reacción para la amplificación del codón 72 de p53.	57
22. Condiciones del programa para la amplificación del codón 72 de p53.	57
23. Mezcla para preparar los geles de poli(acrilamida) al 12%.	58

24. Condiciones de reacción para la amplificación de los codones 12 y 13 de K-ras.	59
25. Condiciones del programa para la amplificación de los codones 12 y 13 de K-ras.	60
26. Condiciones de reacción para la amplificación del codón 12 de H-ras.	62
27. Condiciones del programa para la amplificación del codón 12 de H-ras.	62
28. Grado de diferenciación de los CaCU.	64
29. Grado de invasión de los CaCU.	65
30. Características de la población.	65
31. Antecedentes de la población.	66
32. Frecuencia de tipos de HPVs.	69
33. Frecuencia de HPV de acuerdo al estadio del CaCU.	70
34. Frecuencia de integración y grado de invasión.	72
35. No. de copias de HPV-16 de acuerdo al grado de invasión.	75
36. Frecuencia de alelos de DQA.	77
37. Frecuencia de genotipos de DQA.	77
38. Frecuencia de los alelos DQB.	79
39. Frecuencia de genotipos DQB.	80
40. Frecuencia de los haplotipos DQA-DQB.	81
41. Frecuencia de los alelos DR3 y DR4.	83
42. Frecuencia de genotipos de p53.	84
43. Distribución de los genotipos de acuerdo al diagnóstico histopatológico.	85



UNANIL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

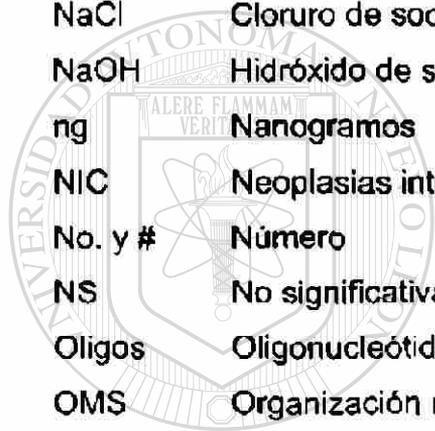
LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Esquema de la zona de transformación del cérvix.	4
2. Estadios del CaCU.	5
3. Patogénesis multifactorial del condiloma y la neoplasia cervical.	8
4. Puntos clave del ciclo celular en células de mamíferos.	10
5. Marcos de lectura del HPV tipo 16.	12
6. Mapa molecular del MHC humano.	17
7. Estrategia General (primera parte).	26
8. Estrategia General (segunda parte).	27
9. Estrategia para la detección de HPV.	37
10. Esquema de una hibridación reversa.	38
11. Diagrama de detección de la integración del HPV.	42
12. Análisis de DNAs en geles de agarosa al 1%.	67
13. Amplificación y Tipificación de HPVs.	68
14. Amplificación de los genes E1 y E2 del HPV 16.	71
15. Integración de acuerdo al estadio del CaCU.	72
16. Amplificación del gen E6 y curva de calibración para cuantificar el número de copias de HPV-16.	73
17. Gráfico de frecuencia del número de copias virales/100 ng de DNA genómico vs tipo de cáncer.	74
18. Tipificación con el estuche del marcador HLA-DQA.	76
19. Amplificación de los alelos DQB.	78
20. Amplificación de los alelos DR3 y DR4.	82
21. Amplificación de los alelos Arginina/Prolina en el codón 72 del gen p53.	84
22. Detección de mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras.	86
23. Detección de mutaciones en el codón 12 del oncogen H-ras.	86

NOMENCLATURA

A	Homocigoto para arginina
AO	Anticonceptivos orales
AP	Heterocigoto para arginina/prolina
Arg	Arginina
Ca	Cáncer
CaCU	Cáncer Cérvico-Uterino
Cel	Células
cm	Centímetros
cols.	Colaboradores
CS	Compañeros sexuales
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Trifosfato de desoxiribonucleósidos
DS	Desviación estándar
EUA	Estados Unidos de América
FIGO	Federation Internationale de Gynecologie et d'Obstétrique
FQ	Fibrosis quística
HCl	Ácido clorhídrico
HLA	Antígenos leucocitarios humanos
HSIL	Lesiones intraepiteliales escamosas de alto riesgo
HPV	Papilomavirus humanos
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Intervalos de confianza
IVSA	Inicio de la vida sexual activa
Kb	Kilobases
LCR	Región controladora del locus
LSIL	Lesiones intraepiteliales escamosas de bajo riesgo
LT	Linfotoxina
M	Marcador de peso molecular

MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Concentración milimolar
µg	Microgramos
µl	Microlitros
µM	Concentración micromolar
N	Total de muestras
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
ng	Nanogramos
NIC	Neoplasias intraepiteliales cervicales
No. y #	Número
NS	No significativa
Oligos	Oligonucleótidos
OMS	Organización mundial de la salud
Pa	Pacientes
P	Homocigoto para prolina
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	-log [H ⁺]
Pro	Prolina
RFLPs	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
rpm	Revoluciones por minuto
SA-HRP	Estrepto vidina-peroxidasa de rábano
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
STD	Estándar
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>



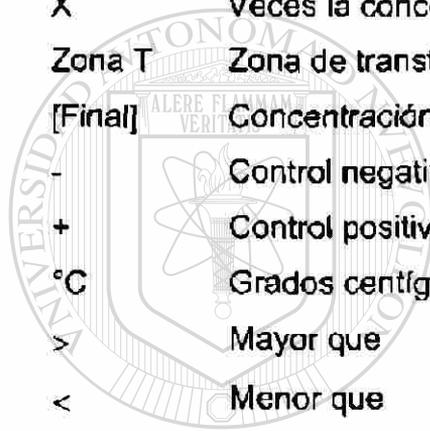
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TEMED	N, N, N', N'-tetrametilendiamina
TMB	Tetrametilbencidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
U	Unidades
U.A.N.L.	Universidad Autónoma de Nuevo León
ULIEG	Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas
V	Volts
Vol.	Volumen
vs	Versus
VSAN	Vida sexual activa negada
X	Veces la concentración
Zona T	Zona de transformación
[Final]	Concentración final
-	Control negativo
+	Control positivo
°C	Grados centígrados
>	Mayor que
<	Menor que
%	Por ciento



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

	Página
I INTRODUCCIÓN	1
1.1 CÁNCER	1
1.2 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO, un importante problema de salud	3
1.3 HISTOPATOLOGÍA DEL CaCU	3
1.4 FACTORES RELACIONADOS AL CaCU	6
1.4.1 FACTORES EXTRÍNSECOS ASOCIADOS AL CaCU	7
1.4.1.1 HPV como causa del CaCU	9
1.4.1.1A Virus del Papiloma Humano (HPV)	10
1.4.1.1B Epidemiología del HPV	12
1.4.1.2 Integración del HPV	13
1.4.1.3 Número de copias del HPV	14
1.4.2 FACTORES INTRÍNSECOS ASOCIADOS AL CaCU	14
1.4.2.1 Complejo mayor de histocompatibilidad	15
1.4.2.2 Polimorfismo de p53	18
1.4.2.3 Mutaciones en los genes RAS	19

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

II JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	21
2.1 JUSTIFICACIÓN	21
2.2 OBJETIVOS	22
2.2.1 OBJETIVO GENERAL	22
2.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES	22
III ESTRATEGIA GENERAL	24

IV MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1 MATERIALES	28
4.1.1 ÁREA DE TRABAJO	28
4.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO	28
4.1.3 REACTIVOS QUÍMICOS	29
4.1.4 MATERIAL DE LABORATORIO	30
4.1.5 EQUIPO DE LABORATORIO	31
4.1.6 APOYO COMPUTACIONAL	31
4.2 MÉTODOS	32
4.2.1 TIPO DE ESTUDIO	32
4.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LAS PACIENTES	32
4.2.3 MUESTRAS DE CASOS Y CONTROLES	33
4.2.4 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	33
4.2.4.1 Extracción de DNA genómico a partir de muestras de sangre	33
4.2.4.2 Extracción de DNA genómico a partir de las biopsias de cérvix	34
4.2.4.3 Evaluación de la calidad y la concentración de DNA	35
4.2.5 ANÁLISIS DE FACTORES EXTRÍNSECOS (HPV)	36
4.2.5.1 Detección de 27 tipos de HPV	36
4.2.5.1A Amplificación del HPV	38
4.2.5.1B Verificación de los productos amplificados	40
4.2.5.1C Hibridación y detección de los HPV	40
4.2.5.2 Determinación de la integración del HPV tipo 16	41
4.2.5.2A Amplificación del gen E1 y E2	42
4.2.5.2B Verificación de los productos amplificados	44
4.2.5.3 Determinación del número de copias virales del HPV tipo 16	44
4.2.5.3A Amplificación del gen E6 para determinar el número de copias	45
4.2.5.3B Verificación de los productos amplificados	46
4.2.5.3C Semicuantificación del no. de copias de HPV 16	46
4.2.6 ANÁLISIS DE FACTORES INTRÍNSECOS (HLA, p53 Y ONCOGENES RAS)	47

4.2.6.1	Determinación de los alelos HLA-DQA	47
4.2.6.1A	Amplificación de HLA-DQA	47
4.2.6.1B	Verificación de los productos amplificados	48
4.2.6.1C	Tipificación de los alelos HLA-DQA por hibridación reversa en mancha	48
4.2.6.2	Determinación de los alelos HLA-DQB	49
4.2.6.2A	Amplificación de HLA-DQB	51
4.2.6.2B	Verificación de los productos amplificados	52
4.2.6.2C	Identificación de los alelos HLA-DQB	52
4.2.6.3	Determinación de los alelos HLA-DR3 y HLA-DR4	53
4.2.6.3A	Amplificación de HLA-DR3 y HLA-DR4	54
4.2.6.3B	Verificación de los productos amplificados	55
4.2.6.4	Identificación del polimorfismo de p53	56
4.2.6.4A	Amplificación del polimorfismo de p53	56
4.2.6.4B	Verificación de los productos amplificados	57
4.2.6.5	Detección de mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras	58
4.2.6.5A	Amplificación de los codones 12 y 13 de K-ras	59
4.2.6.5B	Verificación de los productos amplificados	60
4.2.6.5C	Digestión con enzimas de restricción	60
4.2.6.5D	Resolución de los productos de digestión	61
4.2.6.6	Detección de mutaciones en el codón 12 de H-ras	61
4.2.6.6A	Amplificación del codón 12 de H-ras	61
4.2.6.6B	Verificación de los productos amplificados	62
4.2.6.6C	Digestión con enzimas de restricción	63
4.2.6.6D	Resolución de los productos de digestión	63
4.2.7	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	63
V	RESULTADOS	64
5.1	DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS	64
5.2	DATOS DE GENÉTICA MOLECULAR	66

5.2.1 BANCO DE DNA GENÓMICO	66
5.2.2 FACTORES EXTRÍNSECOS	68
5.2.2.1 Detección y tipificación de HPV's	68
5.2.2.1A Amplificación y tipificación de HPV's	68
5.2.2.1B Frecuencias de HPV's	69
5.2.2.2 Integración del HPV 16	70
5.2.2.2A Amplificación y verificación de los productos amplificados de los genes E1 y E2	70
5.2.2.2B Frecuencia de integración	71
5.2.2.3 Número de copias del HPV 16	73
5.2.2.3A Amplificación y verificación del producto amplificado del gen E6 del HPV 16	73
5.2.2.3B Asociación del número de copias virales y características de los CaCU	74
5.2.3 FACTORES INTRÍNSECOS	75
5.2.3.1 Determinación de los alelos DQA	75
5.2.3.1A Detección y tipificación de los alelos DQA	75
5.2.3.1B Frecuencia de los alelos DQA	76
5.2.3.2 Determinación de los alelos DQB	78
5.2.3.2A Detección e identificación de los alelos DQB	78
5.2.3.2B Frecuencia de los alelos DQB	79
5.2.3.3 Determinación de los alelos DR3 y DR4	82
5.2.3.3A Detección de los alelos DR3 y DR4	82
5.2.3.3B Frecuencia de los alelos DR3 y DR4	83
5.2.3.4 Determinación del polimorfismo en el codón 72 del gen p53	83
5.2.3.4A Detección del polimorfismo en el codón 72 del gen p53	83
5.2.3.4B Frecuencia del polimorfismo en el codón 72 del gen p53	84
5.2.3.5 Determinación de las mutaciones presentes en Ras	85
5.2.3.5A Detección de las mutaciones en los oncogenes K- y H-ras	85
5.2.3.5B Frecuencia de mutaciones en los oncogenes Ras	87

VI DISCUSIÓN	88
VII CONCLUSIONES	96
VIII PERSPECTIVAS	98
• REFERENCIAS	99



- **ANEXO I**
Cuestionario
Carta de consentimiento informado
- **ANEXO II**
Contribuciones científicas

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 CÁNCER

El cáncer es la segunda causa más común de muerte en México y EUA, después de las enfermedades cardiovasculares. Según el Registro Histopatológico de Neoplasias en México en 1997, las cinco neoplasias más frecuentes fueron cérvico-uterino (22.9%), mama femenina (10.3%), glándula prostática (6%), ganglios linfáticos (4.7%) y estómago (4.2%)¹. El cáncer afecta a individuos de todas las edades y a una extensa variedad de órganos. La frecuencia de muchos de los cánceres aumenta con la edad, de modo que conforme el promedio de vida de los seres humanos se incrementa y la calidad de vida de éstos mejora, un número mayor desarrollará la enfermedad².

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

El cáncer es caracterizado por una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede al tejido normal, que no está coordinado con él, y que puede llevar a una invasión de tejido local y metástasis sistémicas³. Recientemente, el cáncer ha sido considerado como una enfermedad genética, clasificándose como desorden somático acumulativo, al lado de los desórdenes mendelianos, las cromosomopatías, los desórdenes mitocondriales, las enfermedades monogénicas y las multifactoriales⁴.

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

tanto en genes que activan la división celular, como en otros que vigilan y ordenan eliminar células potencialmente cancerosas (proto-oncogenes, genes supresores de tumor y genes involucrados en la activación de la transcripción del ciclo celular y la apoptosis), interrumpiendo el mecanismo normal que controla la proliferación celular⁵. En la mayoría de los casos, las mutaciones ocurren después del evento de fecundación en una célula en particular, y están restringidas a las células hijas que se derivan (clonas) de ésta. Esta clona acumula mutaciones en su material genético y durante el transcurso del tiempo da origen a un tumor maligno⁶.

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

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

1.2 CÁNCER CÉRVICO-UTERINO, un importante problema de salud

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

A pesar de los extensos programas de detección temprana de CaCU mediante citología exfoliativa, que han reducido globalmente la mortalidad en más de un 70%⁹, por diversas razones éstos no han presentado el mismo impacto en todas las poblaciones y se estima que las fallas de detección temprana son responsables hasta de un 60% de la mortalidad por esta neoplasia¹⁰. Por lo antes mencionado, el diseñar nuevas estrategias que permitan la detección temprana de esta patología, o aún mejor, que lleven a identificar a las mujeres en riesgo de desarrollar CaCU antes de presentarlo, representa una de las alternativas para combatir este tipo de cáncer.

1.3 HISTOPATOLOGÍA DEL CaCU

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

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



Figura 1. Esquema de la zona de transformación del cérvix. Se observa la zona de transformación, lugar donde se lleva a cabo la metaplasia escamosa (transformación del epitelio columnar a escamoso) en las diferentes etapas de la vida desde el nacimiento hasta después de la menopausia. Modificado a partir de Tenorio-González F¹².

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

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

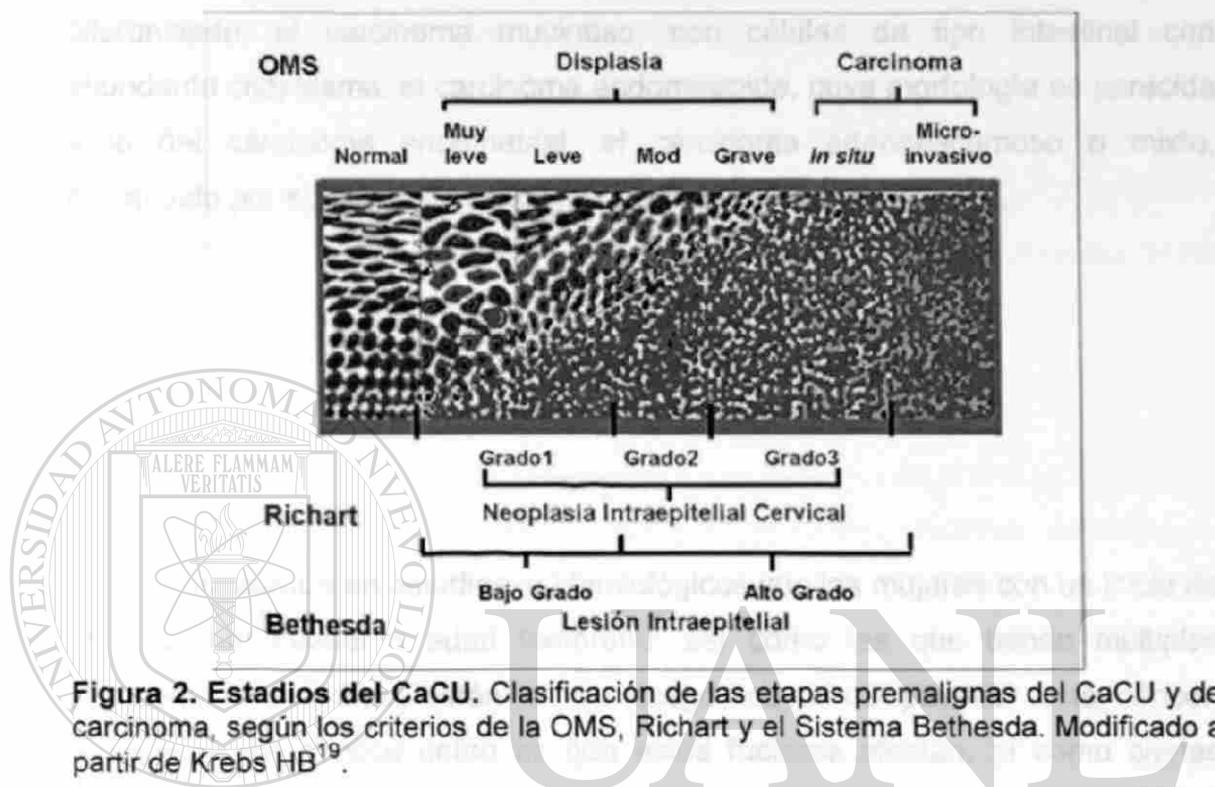


Figura 2. Estadios del CaCU. Clasificación de las etapas premalignas del CaCU y de carcinoma, según los criterios de la OMS, Richart y el Sistema Bethesda. Modificado a partir de Krebs HB¹⁹.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

El carcinoma escamoso del exocérnix es el más frecuente, entre 75 a 80%.

Según la morfología celular, se clasifican como de células grandes no queratinizantes, de células grandes queratinizantes y de células pequeñas no queratinizantes. Esta subclasificación tiene implicaciones pronósticas: en los tumores con células grandes queratinizantes la sobrevida es de 68.5%, con células grandes queratinizantes es de 41.7% y con células pequeñas no queratinizantes es de 20%¹².

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

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

1.4 FACTORES RELACIONADOS AL CaCU

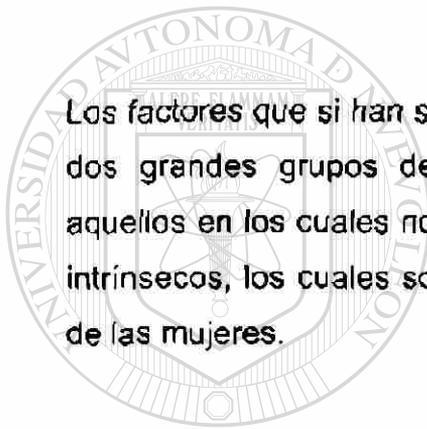
Se ha demostrado en estudios epidemiológicos que las mujeres con un inicio de su actividad sexual a edad temprana, así como las que tienen múltiples compañeros sexuales, están en un riesgo mayor de padecer este cáncer, aunque no se conoce como es que estos factores afectan, ni como ciertas características sexuales específicas afectan el riesgo, pero se cree que en edades tempranas existe un incremento de la susceptibilidad del cérvix, debido a la metaplasia pavimentosa que está ocurriendo¹³.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Existen otros factores de riesgo asociados, como son: 1) los patrones demográficos: el CaCU es más frecuente en Latinoamérica y mujeres de clase socioeconómica baja presentan el mayor riesgo, mientras que mujeres judías de Israel el menor riesgo; 2) las deficiencias nutricionales, principalmente de vitamina A, C, D, β -carotenos y folatos; 3) hábito de fumar, pues se han encontrado sustancias carcinogénicas derivadas del cigarro en biopsias de cérvix; 4) el uso de anticonceptivos orales; 5) la paridad; etc¹³.

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

1.4.1 FACTORES EXTRÍNSECOS ASOCIADOS AL CaCU



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se ha podido determinar que la intervención de los papilomavirus humanos (HPV) oncogénicos o de alto riesgo, (tipo 16, 18, 31 y 45) está relacionada con más del 90% de todos los casos de CaCU⁹. Las infecciones por HPVs son resueltas por el huésped en un 30-60% si son displasias, aunque no se logra la eliminación del virus; pero un pequeño porcentaje (1%) de mujeres con infección crónica no resuelta, ésta evoluciona a CaCU invasor (tabla 1 y figura 3)^{16, 17, 18, 19, 20, 21}.

Tabla 1. Historia Natural de las Neoplasias Intraepiteliales Cervicales

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

Modificado a partir de Disaia PS²⁰

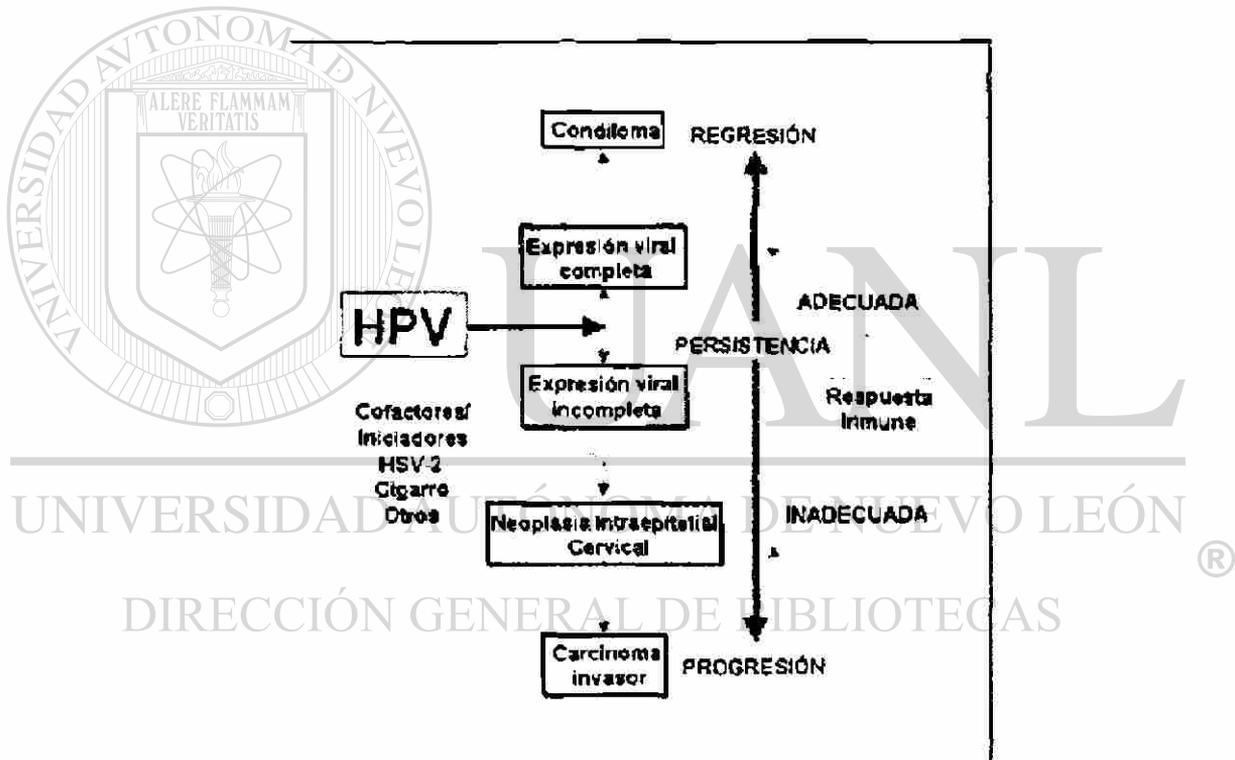


Figura 3. Patogénesis multifactorial del condiloma y la neoplasia cervical. La expresión y replicación viral completa en las células escamosas cervicales se manifiestan por la proliferación, maduración y formación de condilomas ordinarios. La expresión viral incompleta resulta en la proliferación de células inmaduras donde se potencia la integración del virus en los cromosomas del huésped. En éstas se produce la expansión clonal y transformación del epitelio, hasta evolucionar a una enfermedad neoplásica invasiva. La persistencia y progresión neoplásica son facilitadas muy probablemente por una disminución de la vigilancia del sistema inmune. Modificado a partir de González de León C²¹.

1.4.1.1 HPV como causa del CaCU

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

- 1) El DNA viral se encuentra en más del 90% de dichos tumores (más frecuentemente el DNA del HPV tipo 16)⁹;
- 2) En los tumores, el DNA del HPV se integra al genoma celular, rompiendo e inactivando el gen E2. Esto favorece la expresión de los oncogenes virales E6 y E7²²;
- 3) Los oncogenes de HPV de alto riesgo son capaces de inmortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos, pero necesitan la cooperación del oncogen ras para transformarlos. Además, al cultivar durante tiempos largos las células inmortalizadas por E6 y E7, éstas dan origen a clonas malignas, lo que sugiere que un gen celular se modifica en dichos cultivos²²;
- 4) Las oncoproteínas virales E6 y E7 destruyen la actividad de las proteínas antioncogénicas (supresoras de tumores) p53 y pRb, respectivamente²³,²⁴. Estas últimas dos proteínas están implicadas en funciones importantes del control del ciclo celular y su inactivación conduciría a la transformación maligna en CaCU (figura 4)²⁵.

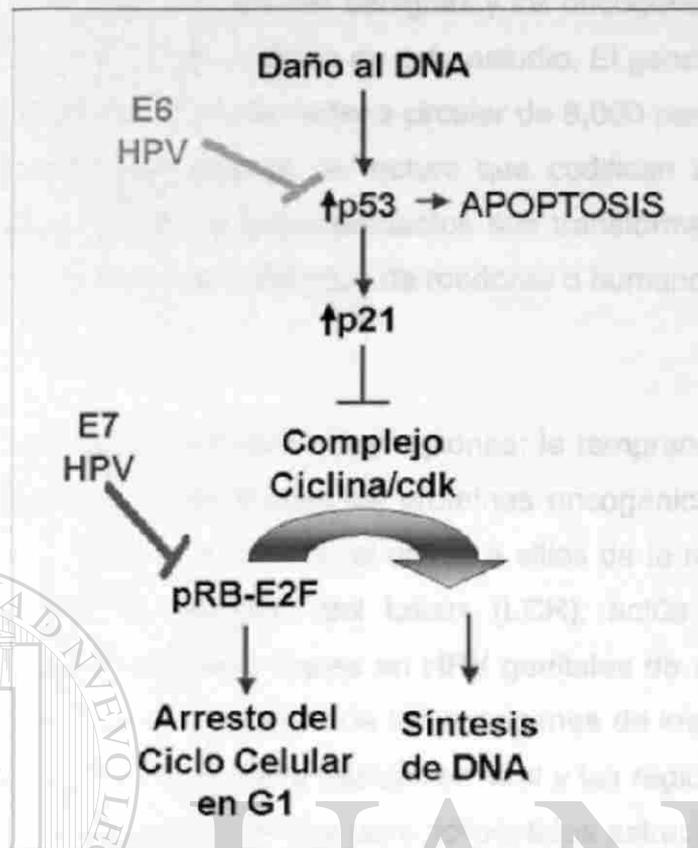


Figura 4. Puntos clave del ciclo celular en células de mamíferos. Al dañarse el DNA se produce acumulación de la proteína p53. Esta acumulación incrementa a su vez los niveles de la proteína p21, la cual inhibe la activación del complejo ciclina/cdk y previene la fosforilación de pRB. Los factores de transcripción E2F permanecen asociados a pRB-hipofosforilado y son incapaces de activar la transcripción de los genes requeridos para la progresión de G1 a la fase S. Consecuentemente el ciclo celular se detiene en G1. Los HPVs de alto riesgo pueden romper el ciclo celular en dos puntos separados: a través de la interacción de E6 con p53 y de E7 con pRB, además de inducir la muerte celular por apoptosis debida al daño celular. Modificado a partir de Vogelstein B¹⁸.

1.4.1.1A Virus del Papiloma Humano (HPV)

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

(bajo riesgo), involucrados en lesiones benignas y los oncogénicos (alto riesgo), como los implicados en el tumor objeto de este estudio. El genoma de los HPVs es una molécula de DNA de doble cadena circular de 8,000 pares de bases, en la cual existen numerosos marcos de lectura que codifican alrededor de 10 productos génicos. Algunos de estos productos son transformantes cuando se introducen en cultivos celulares primarios de roedores o humanos²⁶.

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

Tabla 2. Genes del HPV

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

Modificada a partir de Muñoz N⁹.

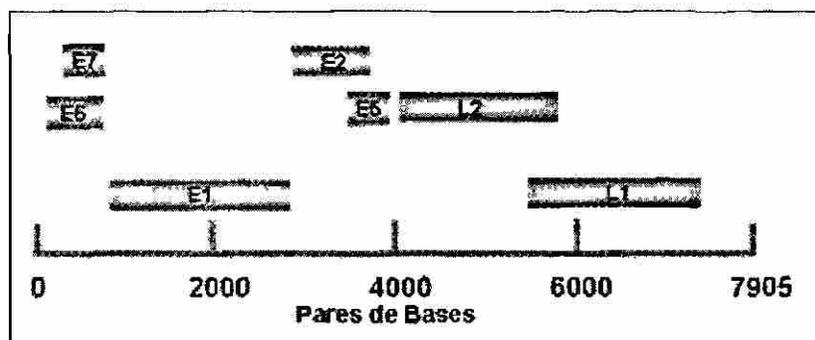


Figura 5. Marcos de lectura del HPV tipo 16. El DNA presenta tres marcos de lectura, por lo que las cajas representan los diferentes genes en cada uno de los marcos. Las cajas designadas como L codifican para las proteínas estructurales y las E para las proteínas regulatorias. Modificado a partir de Matlashewski G²⁶.

1.4.1.1B. Epidemiología del HPV

La mayoría de los datos de epidemiología sobre HPV han sido revisados y publicados en la monografía de la IARC (International Agency for Research on Cancer). El mejor ejemplo es un estudio realizado por Bosch y colaboradores en el 1995, donde se analizaron 932 biopsias de cáncer de todo el mundo²⁸. El análisis inicial mostró una prevalencia de HPV de un 93%. Posteriormente Jacobs y colaboradores en el 1997, analizando las mismas muestras pero utilizando diferentes juegos de iniciadores, encontraron una prevalencia de HPV de un 99%²⁹.

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

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

1.4.1.2 Integración del HPV

Durante el ciclo normal del HPV, el DNA viral está en forma episomal en el núcleo de la célula infectada. Esto se refleja en las infecciones por HPV productivas, histológicamente clasificadas como lesiones premalignas de bajo riesgo (NIC I). Sin embargo, en las lesiones de alto grado (NIC II-III) y en los carcinomas, los genomas virales se encuentran integrados a la secuencia del huésped. La frecuencia de regresión espontánea de la infección disminuye de los NIC I a los NIC III, lo cual se correlaciona con el incremento de integración del HPV. Estos cambios sugieren que la recombinación del DNA viral en la secuencia celular del huésped da como resultado un ventaja de crecimiento y por consiguiente su transformación a célula cancerosa. Se sabe que para la integración del virus usualmente se requiere de la ruptura de los marcos de lectura de E1, E2 o ambos, dando como resultado la pérdida de expresión de estas proteínas. Los genes E1 y E2 actúan como represores de los promotores que dirigen la expresión de E6 y E7, por lo que la integración del virus conlleva a la sobreexpresión de estas oncoproteínas³⁸. En el apartado 1.4.1.1 se explica la acción que producen estas oncoproteínas a nivel del ciclo celular.

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

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

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

1.4.1.3 Número de copias del HPV

Otro factor poco estudiado, es la carga viral presente en las infecciones por HPV. Existen algunos estudios en los cuales se ha observado que el número de copias de HPV tipo 16 es mayor al incrementarse la gravedad de la neoplasia (NICI, NICII, NICIII), y por consiguiente el riesgo de presentar CaCU es proporcional a la cantidad de HPV tipo 16 presente en las células^{41, 42, 43, 44}. Sin embargo, un estudio en el cual se analizaron muestras de CaCU se observó que el número de copias disminuía al incrementar el estadio clínico, pero se asociaba con el grado de diferenciación histológica⁴⁵.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.4.2 FACTORES INTRÍNSECOS ASOCIADOS AL CaCU

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

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

Dentro de los factores intrínsecos se destacan varios de especial interés. El primero se refiere al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés, *major histocompatibility complex*) y la *inmuno-tolerancia a la infección crónica viral*¹⁴; mientras que el segundo, a la *predisposición genética al CaCU conferida por un polimorfismo en el gen codificante para la proteína supresora de tumores p53*⁵⁰. También se piensa que la activación de Ras podría ser un evento adicional en la patogénesis de este cáncer.

1.4.2.1 Complejo mayor de histocompatibilidad

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

El reconocimiento de los antígenos por medio de las células T está restringido por los productos polimórficos del MHC, una región genética muy grande que codifica para las moléculas de clase I y II, así como para otras proteínas. Las moléculas del MHC son extremadamente polimórficas, con hasta 150 alelos comunes o más, para cada gen individual⁴⁶.

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

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

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

pacientes británicas, el haplotipo DQA1*0102-DQB1*0602 incrementa el riesgo de desarrollar NIC al tener una infección con HPV 16⁵¹.

Estas moléculas influyen la respuesta inmune y son responsables de la pérdida de la vigilancia inmunológica contra el proceso maligno.

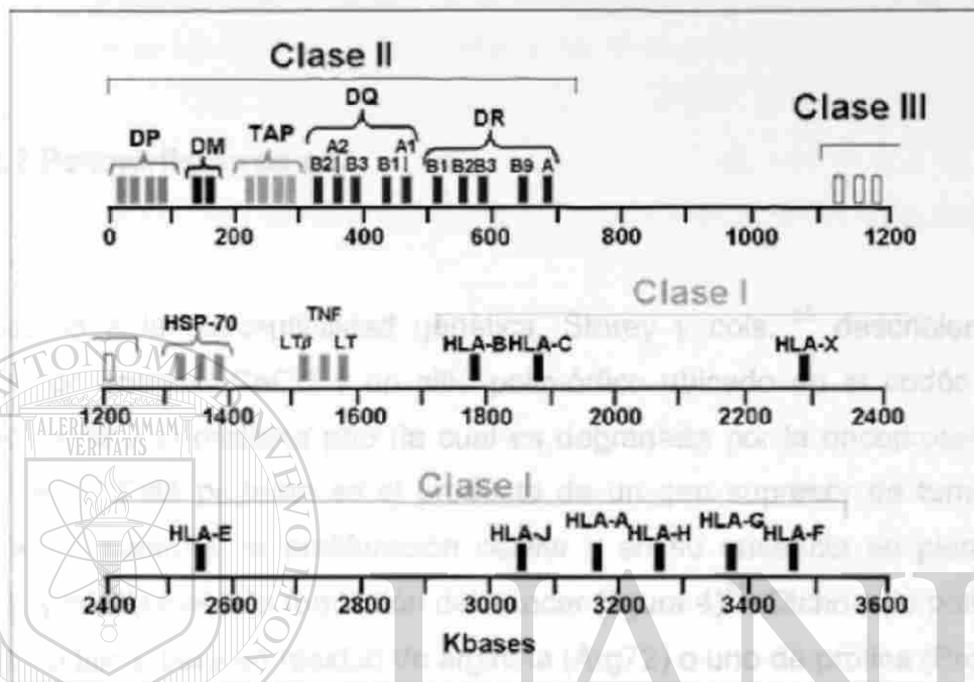


Figura 6. Mapa de los genes del MHC humano. HLA-F, G, H, J y X son moléculas similares a las de clase I. Este mapa está simplificado para excluir a otros genes similares a los de clase I y II, genes sin interés inmunológico, y numerosos genes de función desconocida. El patrón de los genes de clase II puede variar según el alelo heredado. Los genes DM, TAP y el proteosoma contribuyen al ensamblaje de la molécula de MHC; C2, C4A, C4B y el factor B son proteínas del complemento; HSP-70 es una proteína de shock térmico; la linfotoxina (LT), linfotoxina β (LT β) y el factor de necrosis tumoral (TNF) son genes de citoquinas. Modificado a partir de Abbas AK⁴⁸.

En población hispana se ha encontrado asociación significativa entre el CaCU invasor y el haplotipo DRB1*1501-DQB1*0602⁵². En mujeres hondureñas se encontró un RR de 3.45 en pacientes con CaCU que presentaban el alelo HLA-DQA1*0301⁵³. Mientras que en un estudio realizado en población mexicana, se observó que la frecuencia de HLA-A2 y HLA-DR5 se encontraba incrementada en pacientes, al compararse con controles sanos⁵⁴.

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

1.4.2.2 Polimorfismo de p53

En cuanto a la susceptibilidad genética, Storey y cols.⁵⁵ describieron una asociación entre el CaCU y un sitio polimórfico ubicado en el codón 72 del transcrito para la proteína p53 (la cual es degradada por la oncoproteína viral E6 *in vivo*). Esta proteína es el producto de un gen supresor de tumor cuya función es controlar la proliferación celular y en su ausencia se pierde este control y contribuye a la formación del cáncer (figura 4)²⁵. Dicho sitio polimórfico puede codificar para un residuo de arginina (Arg72) o uno de prolina (Pro72). La oncoproteína E6 de los HPVs 16 y 18 degrada más efectivamente a p53Arg que a p53Pro *in vivo*. En este estudio, el alelo Arg72 estuvo presente en el 76.7% de las pacientes afectadas y tan solo en un 36% de las controles sanas, mientras que el genotipo Pro/Arg estuvo presente en un 16.7% en los tumores comparado con un 58.5% de los controles. Con base en lo anterior, concluyeron que el genotipo homocigoto Arg72/Arg72 confería una susceptibilidad 7 veces mayor a la tumorigénesis por HPVs oncogénicos que el genotipo heterocigoto. No se encontró diferencia significativa en la frecuencia del alelo homocigoto para Pro72. De esta forma, el polimorfismo que codifica para el alelo de Arg se le ha postulado como un factor de riesgo importante en el desarrollo de cánceres asociados con HPVs. Makni⁵⁶ y Zhbe⁵⁷ confirmaron la asociación del polimorfismo de p53, mientras que un sin fin de estudios rechazan esta asociación con el CaCU^{58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72}.

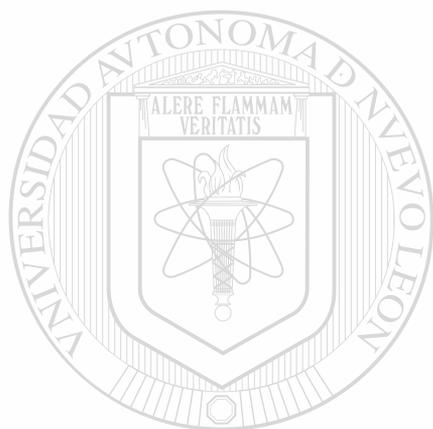
1.4.2.3 Mutaciones en los genes RAS

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

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

La familia Ras está constituida por 3 genes: N-ras, H-ras y K-ras y aunque tienen estructuras genéticas diferentes, todas codifican para proteínas de 189 aminoácidos, genéricamente designadas como p21 por su peso molecular (21Kda). La proteína ras normal actúa en la célula como un elemento transductor de señal, como intermediario de una cascada, recibe señales estimuladoras del crecimiento, frecuentemente liberadas por receptores mitógenos de la superficie celular, y las pasa hacia las moléculas blanco que a su vez estimulan la proliferación celular. Estos genes adquieren propiedades malignas por mutaciones puntuales que afectan la codificación del aminoácido 12, 13 ó 61 de su respectiva proteína⁷⁵.

Wong⁷⁸ encontró una frecuencia de mutaciones en el codón 12 de K-ras de un 61%, mientras que de un 35% en el oncogen H-ras (codón 12) en población oriental. Sin embargo, estos resultados no han sido reproducibles en otras poblaciones, ya que las frecuencias de mutaciones tanto para K-ras y H-ras son muy bajas (24% las más altas en ambos oncogenes)^{79, 80, 81, 82}. A la fecha existen muy pocos reportes relacionados con la búsqueda de mutaciones en estos genes, siendo los resultados muy controversiales.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

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

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 OBJETIVO GENERAL

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

2.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar la extracción de DNA genómico a partir de sangre periférica y de biopsias de tejido fresco, para establecer un banco de DNA proveniente de las pacientes con y sin CaCU.
2. Implementar la técnica de PCR e hibridación reversa para la tipificación de 27 tipos de HPVs a partir del DNA aislado de las biopsias.
3. Implementar la técnica de PCR utilizando iniciadores específicos para tipificar los alelos DQB, DR3 y DR4 a partir del DNA aislado de sangre periférica.
4. Implementar la técnica de PCR utilizando iniciadores específicos descrita por Storey y cols.⁵⁵, para la detección del polimorfismo en el codón 72 del gen p53, a partir del DNA aislado de sangre periférica.

5. **Determinar si existe integración del HPV tipo 16 en el genoma del huésped.**
6. **Determinar el número de copias virales del HPV tipo 16.**
7. **Determinar los alelos de DQA en el DNA recuperado a partir de sangre periférica utilizando la técnica de PCR e hibridación reversa estandarizada en el laboratorio.**
8. **Determinar las mutaciones presentes en el codón 12 y 13 del oncogen K-ras y codón 12 del oncogen H-ras, mediante la técnica de RFLP's.**
9. **Determinar la asociación entre los tipos y frecuencias de HPVs en los DNAs de las biopsias de mujeres con y sin CaCU.**
10. **Determinar la asociación entre los alelos DQA, DQB, DR3 y DR4 en mujeres con y sin CaCU.**
11. **Determinar la asociación entre los haplotipos HLA DQA-DQB en mujeres con y sin CaCU.**
12. **Determinar la asociación entre los genotipos del polimorfismo en el codón 72 del gen p53 en mujeres con y sin CaCU.**
13. **Determinar la frecuencia de mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras y el codón 12 del oncogen H-ras en mujeres con y sin CaCU.**

CAPITULO III

ESTRATEGIA GENERAL

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

1. Se recolectaron un total de 185 biopsias de cérvix de pacientes (85 con y 100 sin CaCU) de las cuales además se obtuvo sangre periférica con EDTA, se extrajo el DNA genómico de las biopsias y sangre y se formó un banco de DNA.
2. Se estimó la calidad y concentración de cada uno de los DNAs en gel de agarosa al 1%.
3. A partir del DNA proveniente de las biopsias y utilizando iniciadores específicos, se amplificaron por PCR las regiones correspondientes del genoma de HPV para la detección de: 1) diferentes tipos de HPV (L1) y 2) E1, E2, E6 y E7 del HPV-16.
4. Así mismo, se amplificaron por PCR los codones 12 y 13 del oncogen K-ras y el codón 12 del oncogen H-ras.

5. A partir del DNA proveniente de sangre, utilizando iniciadores específicos para cada uno, se amplificaron por PCR las regiones correspondientes para la detección de: HLA-DQA, HLA-DQB, HLA-DR3, HLA-DR4 y el polimorfismo en el codón 72 de p53.
6. Se verificó el éxito de las amplificaciones sometiendo el producto amplificado a electroforesis en gel de agarosa al 1 y 2%, según fue necesario.
7. En el caso del polimorfismo en el codón 72 de p53, para la resolución efectiva de los fragmentos dado sus tamaños pequeños, se recurrió a electroforesis vertical en gel de poliacrilamida al 12%, teñido con bromuro de etidio y se observaron con luz ultravioleta.
8. Se generaron imágenes digitalizadas utilizando el equipo de fotodocumentación Gel Doc y se analizaron con el programa computacional Molecular Analyst.
9. En el caso de la detección de tipos de HPVs y HLA DQA, se realizó la hibridación reversa del producto amplificado con sondas oligo-tipo-específicas y oligo-alelo-específicas, respectivamente.
10. Se realizó el análisis estadístico de los datos obtenidos para cada uno de los objetivos planteados.

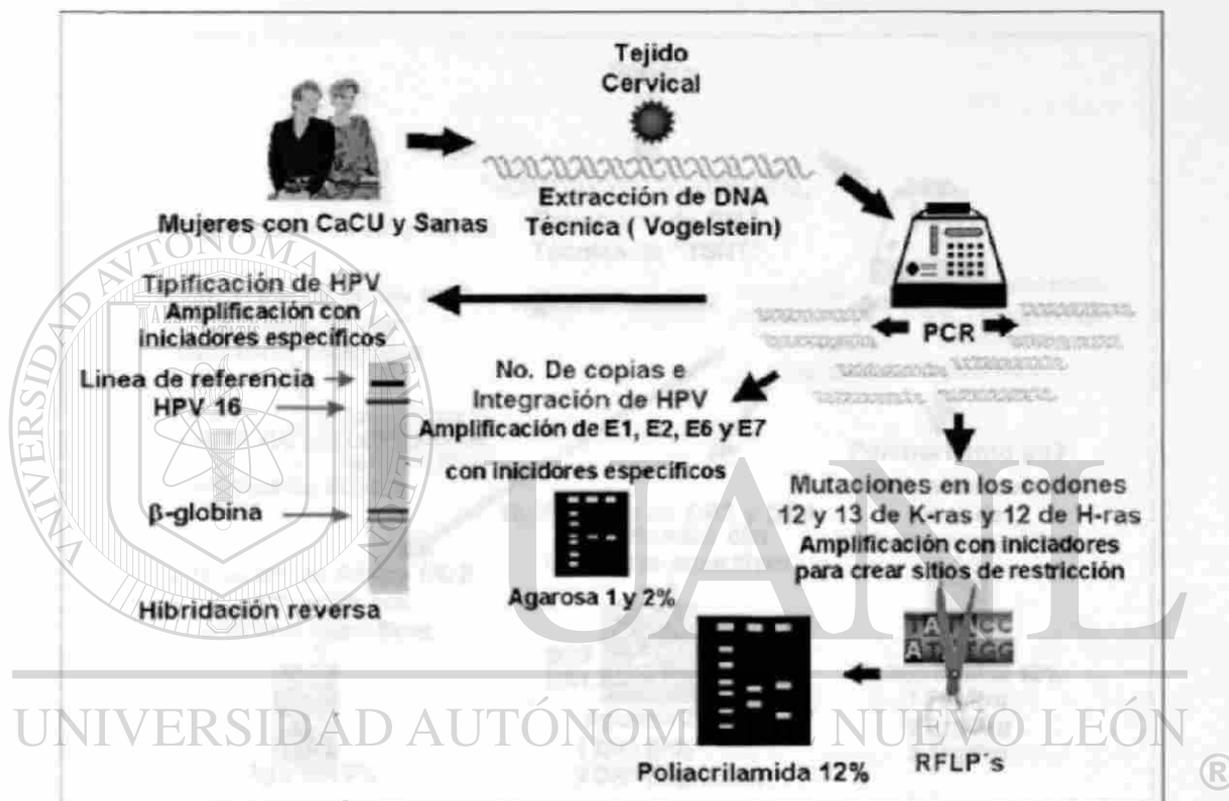


Figura 7. Estrategia General (primera parte). A partir de las muestras de tejido cervical se realizó la extracción de DNA, para continuar con la PCR utilizando iniciadores específicos según fue el caso para la tipificación de HPVs usando posteriormente hibridación reversa, la detección del número de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

CAPÍTULO IV.

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

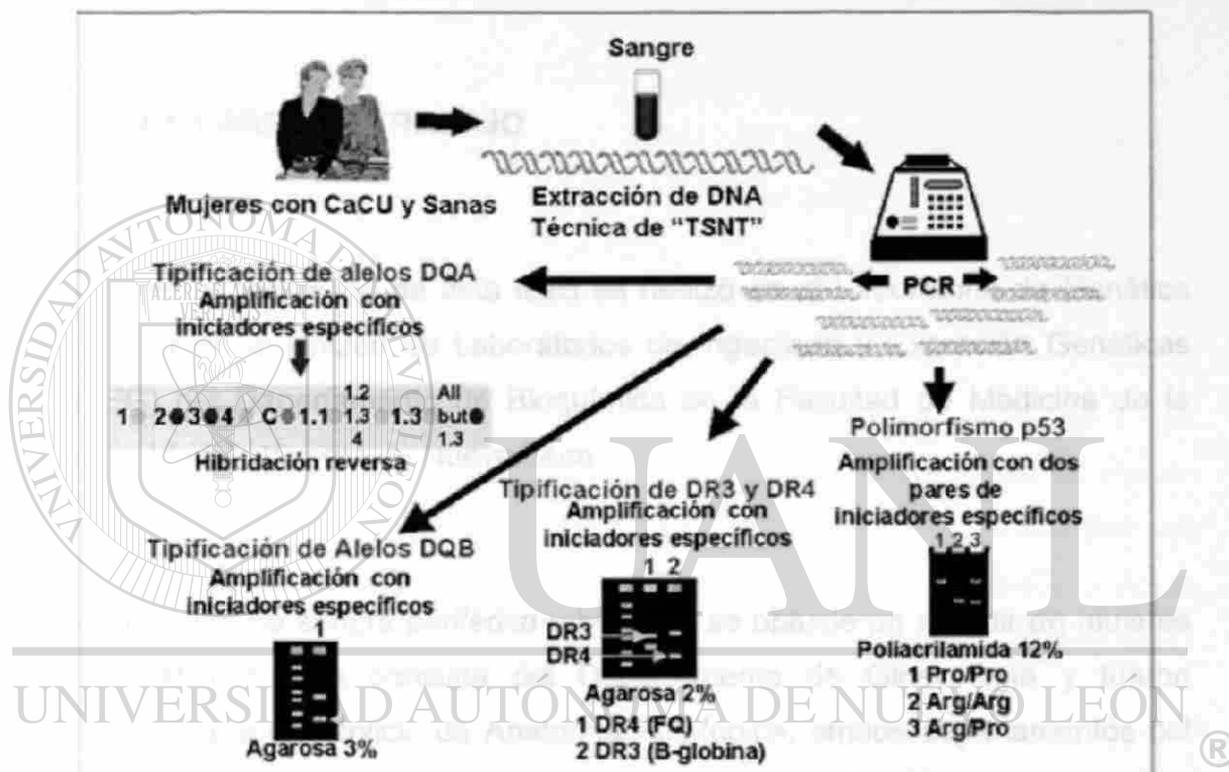


Figura 8. Estrategia General (segunda parte). A partir de las muestras de sangre se realizó la extracción de DNA, para continuar con la PCR utilizando iniciadores específicos según fue el caso para la tipificación de los alelos DQA usando posteriormente hibridación reversa, la tipificación de los alelos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

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 ÁREA DE TRABAJO

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

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

4.1.2 MATERIAL BIOLÓGICO

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

4.1.3 REACTIVOS QUÍMICOS

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

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

Para la electroforesis en geles de agarosa se utilizó agarosa, trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilene cianol y bromuro de etidio mientras que para las electroforesis en geles de poliacrilamida se utilizó acrilamida, N,N-metilenbisacrilamida, TEMED, EDTA, trizma base y bromuro de etidio, todos los anteriores de Sigma Chemical Company. Como marcadores de peso molecular en las electroforesis se utilizó el DNA del plásmido pUC18 y pBS digeridos con las enzimas de restricción *Hae* III o *Alu* I y el DNA de lambda digerido con *Pst* I. Las enzimas de restricción fueron adquiridas en New England Biolabs y los DNAs plasmídicos se obtuvieron mediante técnicas de mediana escala realizadas en nuestro laboratorio siguiendo procedimiento estándares⁸⁴. El marcador de peso molecular corresponde al fago lambda, fue adquirido en Promega (Madison, WI, EUA).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.1.4 MATERIAL DE LABORATORIO

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

4.1.5 EQUIPO DE LABORATORIO

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

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

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

4.1.6 APOYO COMPUTACIONAL DE BIBLIOTECAS

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

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

4.2 MÉTODOS

4.2.1 TIPO DE ESTUDIO

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

4.2.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE LAS PACIENTES

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

4.2.3 MUESTRAS DE CASOS Y CONTROLES

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.4 EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO

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

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

(2% Tritón, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA), mezclando mediante inversión por varios segundos. Posteriormente, se agregaron 5ml de fenol saturado (con Tris-HCl 0.1M, pH 8) y 1 ml de sevag (Cloroformo-alcohol isoamilico 24:1), se mezcló para homogenizar por completo utilizando un vortex. En seguida se agregaron 2ml de buffer TE (Tris 10 mM-EDTA 1mM pH 7.4) y se centrifugó durante 15 min a 10,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo de 15 ml. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se agitó lentamente por inversión hasta observar el DNA precipitado, como una hebra blanca. Utilizando una micropipeta, el DNA se recuperó y transfirió con cuidado a un tubo Eppendorff de 2ml. Se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm en una microcentrífuga y la pastilla obtenida se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifugó nuevamente, se decantó el etanol, se secó el DNA y finalmente se resuspendió en TE⁸⁴.

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

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

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

La fase acuosa final se transfirió a un tubo de 15 ml, se agregaron 0.33 volúmenes de acetato de amonio 10 M y 2.5 volúmenes de etanol al 100%. Se mezcló suavemente por inversión, se dejó precipitar a -70°C durante una hora. El DNA se recuperó con una micropipeta y se transfirió a un tubo eppendorf de 2ml y se centrifugó durante 10 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se decantó y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70%. Esta se secó y se resuspendió en TE⁸⁴.

4.2.4.3 Evaluación de la calidad y la concentración del DNA

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

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

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

4.2.5 ANÁLISIS DE FACTORES EXTRÍNSECOS (HPV)

4.2.5.1 Detección de 27 tipos de HPV

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

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

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

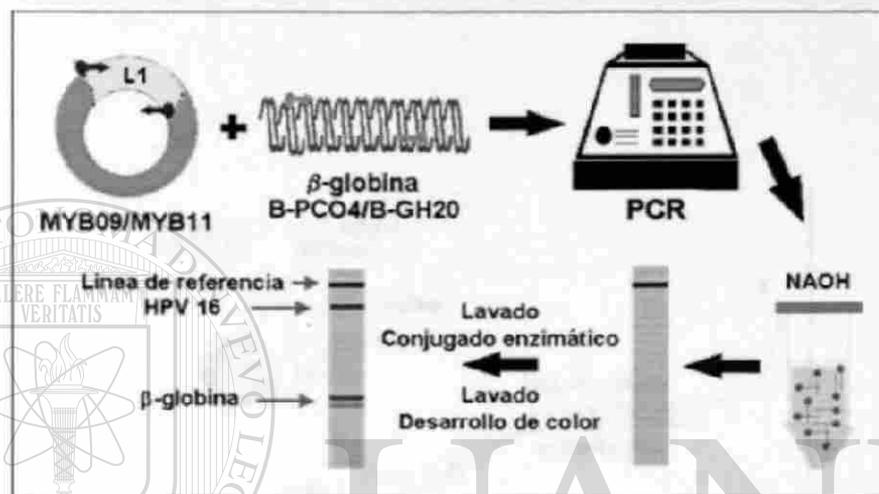


Figura 9. Estrategia para la detección de HPV. Se amplificó la región L1 de los HPV y una porción del gen de la β -globina como control interno. Posteriormente los productos amplificados se desnaturalizaron con NaOH y se hibridaron con las 27 sondas de los diferentes tipos de HPV. Finalmente se realizaron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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

Tabla 3. Tipos de HPVs identificados por el estuche

Tipos de HPVs asociados a cáncer (HPVs de alto riesgo)	Tipos de HPVs no asociados a cáncer (HPVs de bajo riesgo)
16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,55,56,58,59,68 (ME180), (W13B), MM7 (P291), (P238A)	6, 11, 40, 42, 53, 54, 57, 66, MM8 (P155)

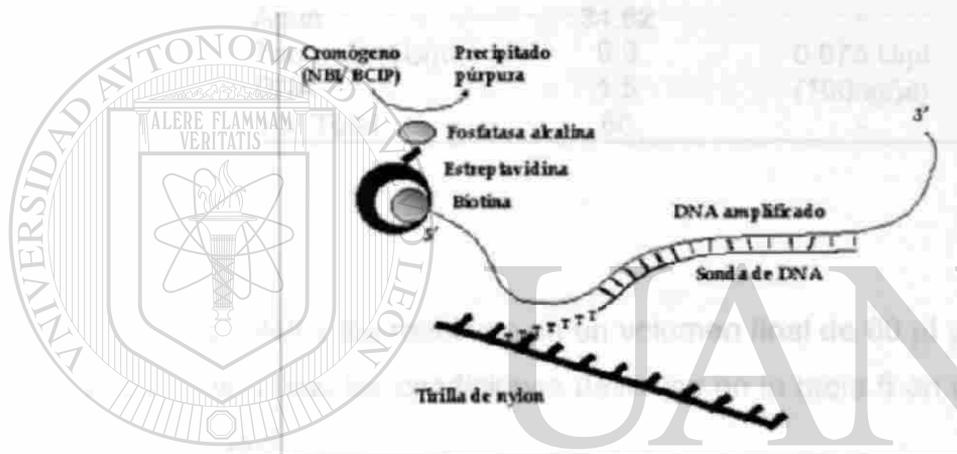


Figura 10. Esquema de una hibridación inversa. La sonda de DNA es retenida al papel de nylon por medio de una cola de poli-T. Después de que el producto amplificado ha sido marcado con biotina, este se incuba con la sonda y se realizan lavados de alta astringencia para eliminar las uniones no específicas,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

4.2.5.1A Amplificación del HPV

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

Tabla 4. Condiciones de amplificación para la detección de HPVs

Reactivo	Volumen (μ l)	[Final]
Buffer 10X	6	1X
MYB09 (50 μ M)	0.6	0.5 μ M
MYB11 (50 μ M)	0.6	0.5 μ M
HMB01 (50 μ M)	0.06	0.05 μ M
BPC04 (50 μ M)	0.06	0.05 μ M
BGH20 (50 μ M)	0.06	0.05 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	14.4	6 mM
dNTPs (10 mM)	1.2	0.2 mM
Agua	34.62	-
Taq gold (5U/ μ l)	0.9	0.075 U/ μ l
DNA	1.5	(100ng/ μ l)
Vol. Total	60	-

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 5. Condiciones del programa para la amplificación de HPVs

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

4.2.5.1B Verificación de los productos amplificados

Cinco μl del producto amplificado más 1 μl de jugo azul 6X se sometieron a electroforesis junto con un marcador de peso molecular adecuado (pUC18 digerido con *Afu* I) para verificar el tamaño de las bandas obtenidas. Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X. La electroforesis se realizó a 80 V al principio hasta que entró la muestra y luego a 110V por alrededor de 1 hora (dejando correr el azul de bromofenol tres cuartas partes del gel). Después de la corrida se procedió a teñir el gel en bromuro de etidio (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) por un tiempo de 5 min y se enjuago con agua corriente, después se observó en el Gel Doc a través del software Molecular Analyst.

4.2.5.1C Hibridación y detección de los HPVs

A 50 μl de producto amplificado se le adicionaron 25 μl de una solución desnaturalizante que contiene NaOH. Se dejó actuar por lo menos 5 min, mientras, se marcó la tira con la clave del paciente y se depositó en la charola donde se llevó a cabo la hibridación. Se prepararon las soluciones de hibridación (4X SSPE, 0.1% SDS) y lavado (1X SSPE, 0.1% SDS) y se calentaron a 53°C. A cada tira se le agregó 3ml de la solución de hibridación caliente, así como 70 μl de la mezcla del producto amplificado en la solución desnaturalizante. Se incubaron en un baño a 53°C a 70 rpm por 30 min. Transcurrido el tiempo se eliminó la solución de hibridación por aspiración con un sistema de vacío y se agregaron 3 ml de solución de lavado (temperatura ambiente) e inmediatamente se eliminó. Se agregaron 3 ml de solución de lavado caliente y se incubaron en el baño por 15 min. Mientras este tiempo transcurría se preparó la solución del conjugado (SA-HRP).

Una vez que pasó este tiempo, se eliminó la solución de lavado y se agregó el conjugado dejándolo a 70 rpm a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se realizaron 2 lavados en agitación con solución de lavado a temperatura ambiente por 10 min. Al término de éstos, se agregaron 3 ml de buffer de citratos y se dejó en reposo mientras se preparó la solución de color (Sustrato A + Sustrato B). Se eliminó el buffer de citratos y se agregaron 3 ml de solución de color y se incubaron en agitación a temperatura ambiente por 5 min. Finalmente las tiras se enjuagaron con agua, se almacenaron en buffer de citratos por espacio de 10 min, se eliminó el exceso y se dejaron secar a temperatura ambiente. Posteriormente se identificó el tipo de HPV utilizando la plantilla que viene en el estuche.

4.2.5.2 Determinación de la integración del HPV tipo 16

La integración del HPV al genoma del huésped se realizó de una manera indirecta, basándonos en que los HPVs requieren de una ruptura en los genes E1 y/o E2 para linearizarse y poderse integrar. Para esta determinación se amplificaron por separado ambos genes y la ausencia de amplificación nos determinó la ruptura del gen, por lo que se asume que el virus está integrado. Esta técnica es precisa cuando no hay amplificación, pues nos indica que el virus está integrado por completo, pero cuando existe la presencia de una banda de amplificación, no podemos asegurar que todo el virus está en forma episomal, puesto que la banda obtenida por virus circulante nos enmascara la no amplificación (figura 11).

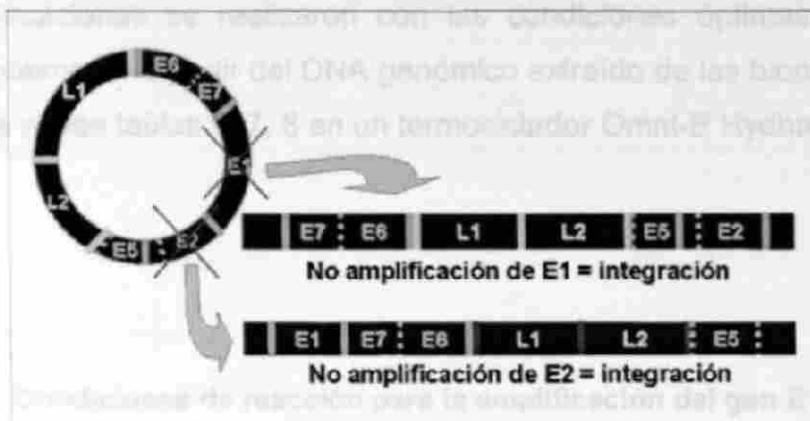


Figura 11. Diagrama de detección de la integración del HPV. Se amplifican los genes E1 y E2 en reacciones por separado y la no amplificación determina la integración del virus.

4.2.5.2A Amplificación del gen E1 y E2

Para este apartado se seleccionaron las muestras que fueron positivas para HPV-16, mediante la técnica descrita en el apartado 4.2.5.1. Las amplificaciones de los genes E1 y E2 se realizaron por separado y para las reacciones se utilizaron los oligos descritos por Berumen⁴⁵, en el caso de la reacción del gen E2 se coamplificó el gen E6 del HPV y los oligos utilizados[®] fueron descritos anteriormente por Tyan y cols.⁸⁵, estos fueron los siguientes:

E1-1	5' taa tct acc atg gct gat cc 3'
E1-2	5' acg ttg gca aag agt ctc ca 3'
E2-1	5' tgg aca ctc ttt gcc aac gt 3'
E2-2	5' ggt cac gtt gcc att cac ta 3'
E6-1	5' caa tgt ttc agg acc cac agg 3'
E6-2	5' gca aca aga cat aca tcg acc g 3'

Las amplificaciones se realizaron con las condiciones óptimas encontradas experimentalmente a partir del DNA genómico extraído de las biopsias de cérvix y descritas en las tablas 6, 7, 8 en un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 6. Condiciones de reacción para la amplificación del gen E1 de HPV-16

Reactivo	Volumen (μ l)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
E1-1 (5 μ M)	4	1 μ M
E1-2 (5 μ M)	4	1 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	1.6	2 mM
dNTPs (10 mM)	0.75	0.375 mM
Agua	5.85	-
Taq DNA pol (5U/ μ l)	0.3	0.075 U/ μ l
DNA	1.5	(100ng/ μ l)
Vol. Total	20	-

Tabla 7. Condiciones de reacción para la amplificación del gen E2 de HPV-16

Reactivo	Volumen (μ l)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
E2-1 (5 μ M)	4	1 μ M
E2-2 (5 μ M)	4	1 μ M
E6-1 (5 μ M)	2	0.5 μ M
E6-2 (5 μ M)	2	0.5 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	1.6	2 mM
dNTPs (10 mM)	0.75	0.375 mM
Agua	1.85	-
Taq DNA pol (5U/ μ l)	0.3	0.075 U/ μ l
DNA	1.5	(100ng/ μ l)
Vol. Total	20	-

Tabla 8. Condiciones del programa para la amplificación del gen E2 de HPV-16

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	1 min	Desnaturalización
3	55°C	2 min	Apareamiento
4	72°C	3 min	Extensión
5	Repetir desde el paso 2,	40 veces	
6	72°C	10 min	Extensión final

4.2.5.2B Verificación de los productos amplificados

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 1% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue lambda digerido con *Pst* I.

4.2.5.3 Determinación del número de copias virales del HPV tipo 16

Para este apartado se seleccionaron las muestras que fueron positivas para HPV-16, mediante la técnica descrita en el apartado 4.2.5.1. La determinación del número de copias virales se realizó de una manera semicuantitativa. Se utilizó el plásmido *psv2-E6*, el cual contiene el gen E6 de HPV-16. A partir de este plásmido se realizaron diluciones hasta obtener un rango de 1 copia del plásmido hasta 10,000 copias. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el número de copias y se amplificó por medio de la PCR.

$$\#cél(copias) = \frac{(DNA \text{ ng}) (No. \text{ de Avogadro})}{(1 \text{ pb}) (\text{tamaño DNA pb})}$$

No. de Avogadro = 6.023×10^{23}

1pb = 660×10^9 ng

Tamaño psv2-E6 = 4,810 pb

4.2.5.3A Amplificación del gen E6 para determinar número de copias

La amplificación se realizó con las condiciones óptimas encontradas experimentalmente (sin llegar a la fase de meseta de la PCR) a partir del DNA genómico extraído de las biopsias de cérvix y descritas en las tablas 9, 10 en un termociclador Omni-E Hydbaid y usando los oligos descritos anteriormente en el apartado 4.2.5.2A Se realizaron 2 PCR utilizando 10 y 100 ng de DNA genómico (1,666 y 16,666 células, respectivamente) para cada una de las muestras.

Tabla 9. Condiciones de la reacción para la amplificación del gen E6 de HPV-16

Reactivo	Volumen (μ l)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
E6-1 (5 μ M)	4	1 μ M
E6-2 (5 μ M)	4	1 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	1.75	2.187 mM
dNTPs (10 mM)	1.25	0.625 mM
Agua	5	-
Taq DNA pol (5U/ μ l)	0.5	0.125 U/ μ l
DNA	1.5	(10 y 100 ng/ μ l)
Vol. Total	20	-

Tabla 10. Condiciones del programa para la amplificación del gen E6 de HPV-16

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	30 seg	Desnaturalización
3	50°C	30 seg	Apareamiento
4	72°C	30 seg	Extensión
5	Repetir desde el paso 2, 27 veces		
6	72°C	30 seg	Extensión final

4.2.5.3B Verificación de los productos amplificados

Los productos amplificados se corrieron en un gel de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.5.1 y el marcador de peso molecular utilizado fue pBS digerido con *Hae* III.

4.2.5.3C Semicuantificación del no. de copias de HPV-16

El análisis de los geles se realizó generando imágenes digitalizadas con el equipo Gel Doc utilizando una integración entre 2 y 4 segundos, dependiendo de los resultados electroforéticos obtenidos para evitar una saturación. Con el software Molecular Analyst, se calculó las cc/mm de cada una de las bandas de las diluciones y de las muestras. Posteriormente haciendo uso del procesador de gráficos Microsoft Excel, se realizó una curva de calibración y se calculó el número de copias de cada una de las muestras, utilizando la ecuación dada por la curva de calibración.

4.2.6 ANÁLISIS DE FACTORES INTRÍNSECOS (HLA, p53 Y ONCOGENES RAS)

4.2.6.1 Determinación de los alelos HLA-DQA

La tipificación del gen HLA-DQA se realizó con el estuche comercial "The AmpliType HLA DQ α 1 PCR Amplification and Typing Kit" de Perkin Elmer que contiene los iniciadores GH26 y GH27³⁶ que incluyen biotina y que amplifican un fragmento de 242 ó 238 pb.

GH26

5' gtg tgc cag gtg taa act tgt acc ag 3'

GH27

5' cac gga tcc ggt agc agc ggt aga gtt g 3'

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.6.1A Amplificación de HLA-DQA

Se siguieron las instrucciones de la casa comercial para las condiciones de amplificación y se describen en las tablas 11, 12. Las amplificaciones se realizaron a partir del DNA genómico extraído de sangre y en un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 11. Condiciones de Reacción para la amplificación de HLA-DQA

Reactivo	Volumen (µl)
Mezcla de reacción	20
Mezcla de oligos	20
DNA (2-10ng)	10
Vol. Total	50

Tabla 12. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DQA

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	1 min	Desnaturalización
2	60°C	30 seg	Apareamiento
3	72°C	30 seg	Extensión
4	Repetir desde el paso 2,	32 veces	
5	72°C	7 min	Extensión final

4.2.6.1B Verificación de los productos amplificados

Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue pBS digerido con *Hae* III.

4.2.6.1C Tipificación de los alelos HLA-DQA por hibridación reversa en mancha

Los productos amplificados obtenidos fueron tipificados realizando una hibridación reversa en mancha con sondas oligo-alelo específicas inmovilizadas

en membranas de nitrocelulosa para 6 alelos de DQA, para lo que se siguió el siguiente procedimiento:

Primeramente, se les adicionó 2.5 ml de EDTA 200mM a cada uno de los productos amplificados y se desnaturalizaron los productos amplificados biotinilados a 95°C por espacio de 5 min en un termociclador. Se colocaron 35 µl de cada producto amplificado en una charola de tipificación junto con 3 ml de solución de hibridación (5X SSPE, 0.5% SDS) y conjugado enzimático estreptovidina-peroxidasa. La hibridación se llevó a cabo a 55°C y con agitación constante de 50 rpm por 30 min. Transcurrido el tiempo de hibridación, se realizaron 2 lavados (2.5X SSPE, 0.1%), uno a temperatura ambiente y otro a 55°C a 50 rpm por 12 min. Se retiró la solución y nuevamente se lavaron las membranas a temperatura ambiente por algunos segundos. Se eliminó la solución y se agregó a cada tira, buffer de citratos (Citrato de sodio 0.1M) pH=5, se agitó a temperatura ambiente por 5 min a 50 rpm. Transcurrido el tiempo, se retiró la solución y se agregaron 3 ml de la solución de desarrollo de color conteniendo el cromógeno TMB y peróxido de hidrógeno. La charola se cubrió con papel aluminio y se agitó a 50 rpm en un agitador orbital a temperatura ambiente hasta observar un precipitado azul (5 a 10 min). Se retiró la solución, se agregó agua destilada para detener la reacción y se agitó por 5 min a 50 rpm, se repitió este último paso una vez más. Se retiró el agua y se dejaron secar las membranas. La tipificación se realizó siguiendo las instrucciones del estuche comercial.

4.2.6.2 Determinación de los alelos HLA-DQB

Para determinar los alelos de HLA-DQB se usaron los 27 oligos específicos descritos por Olerup y cols.³⁷ (tabla 13) y un par de oligos para amplificar una

porción del gen DRB1 como control interno. La amplificación es indicativa de la presencia del alelo correspondiente a la PCR amplificada.

Tabla 13. Secuencia de primers usados para determinar los alelos HLA-DQB

Primer	Secuencia
B5-01	5' cgg agc gcg tgc ggg g 3'
B5-02	5' tgc ggg gtg tga cca gac 3'
B5-03	5' gcc atg tgc tac ttc acc aat 3'
B5-04	5' cgt gcg tct tgt gac cag at 3'
B5-05	5' gga gcg cgt gcg tct tgt a 3'
B5-06	5' cgt gta cca gtt taa ggg ca 3'
B5-07	5' gtg cgt ctt gtg agc aga ag 3'
B5-08	5' gac gga gcg cgt gcg tct 3'
B5-09	5' gac gga gcg cgt gcg tta 3'
B5-10	5' cac caa cgg gac cga gct 3'
B5-11	5' cac caa cgg gac cga gcg 3'
B5-12	5' gtg cgg ggt gtg acc aga t 3'
B5-13	5' cgt gta cca gtt taa ggg cc 3'
B3-01	5' gct gtt cca gla ctc ggc aa 3'
B3-02	5' tgt tcc agt act cgg cgc t 3'
B3-03	5' gcg gcg tca cgg ccc ga 3'
B3-04	5' cag cgt gtc caa ctc cgc t 3'
B3-05	5' gct gtt cca gta ctc ggc at 3'
B3-06	5' gca gga tcc cgc ggt acc 3'
B3-07	5' gca agg tgc tgc gga gct 3'
B3-08	5' ctg ttc cag tac tgg gcg g 3'
B3-09	5' agt act cgg cgt cag gcg 3'
B3-10	5' ctg ttc cag tac tgg gcg t 3'
B3-11	5' ggt agt tgt gtc tgc ata cg 3'
B3-12	5' tgc aca ccc tgt cca cgg 3'
B3-13	5' aac tcc gcc cgg gtc cc 3'
B3-14	5' caa ctc cgc cgg ggt oct 3'
C5	5' tgc caa gtg gag cac cca a 3'
C3	5' gca tct tgc tct gtg cag at 3'

B5 y C5: oligos 5' , B3 y C3: oligos 3'

4.2.6.2A Amplificación de HLA-DQB

Se realizaron 22 reacciones de PCR (tabla 16) por separado a partir del DNA extraído de sangre y con las condiciones óptimas encontradas experimentalmente (tabla 14 y 15). La temperatura de apareamiento fue modificada dependiendo del juego de oligos utilizados en la reacción y el termociclador usado fue un Omni-E Hydbaid.

Tabla 14. Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DQB

Reactivo	Volumen (μl)	[Final]
Buffer 10X	1	1X
C5 (5 μM)	1	0.5 μM
C3 (5 μM)	1	0.5 μM
Oligo 5' (5 μM)*	1	0.5 μM
Oligo 3' (5 μM)*	1	0.5 μM
MgCl ₂ (25 mM)	0.4	1 mM
dNTPs (10 mM)	0.2	0.2 mM
Agua	2.6	-
Taq DNA pol (5U/μl)	0.3	0.15 U/μl
DNA	1.5	(100 ng/μl)
Vol. Total	10	-

*Los oligos varían de acuerdo a la PCR amplificada

Tabla 15. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DQB

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	20 seg	Desnaturalización
2	49°C* ó 50°C**	50 seg	Apareamiento
3	72°C	20 seg	Extensión
4	Repetir desde el paso 2.	30 veces	
5	72°C	5 min	Extensión final

*Temperatura para PCR 1,2,3,4,6,7,8,9,10,11,14,16,17 y 19,20,21 y 22

**Temperatura para PCR 5,12,13,15 y 18

4.2.6.2B Verificación de los productos amplificados

Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 3% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue pBS digerido con *Hae* III.

4.2.6.2C Identificación de los alelos HLA-DQB

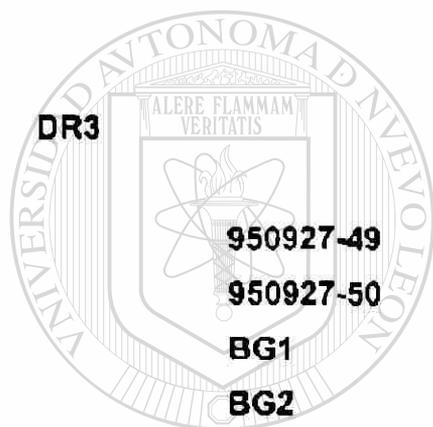
Se utilizó la tabla 16 para discriminar los alelos en las muestras de acuerdo a la amplificación en cada uno de las PCRs:

Tabla 16. PCRs utilizadas para la identificación de los alelos HLA-DQB

PCR	Oligo 5'	Oligo 3'	pb	Alelos DQβ*
1	B5-01	B3-01	128	0501
2	B5-02	B3-02	117	0502
3	B5-02	B3-03	87	0503
4	B5-03	B3-04	198	0601
5	B5-04	B3-05	121	0602
6	B5-05	B3-05	127	0603, 0608
7	B5-06	B3-06	254	0604
8	B5-07	B3-07	205	0201
9	B5-08	B3-08	129	0201, 0302
10	B5-09	B3-09	122	0301, 0304
11	B5-08	B3-09	122	0302, 0303
12	B5-08	B3-10	129	0303
13	B5-10	B3-11	200	0401
14	B5-11	B3-11	200	0402
15	B5-12	B3-02	118	0504
16	B5-13	B3-06	254	0605
17	B5-05	B3-12	176	0606
18	B5-08	B3-13	165	0602, 0603, 0607
19	B5-05	B3-01	127	0604, 0605, 0606, 0607
20	B5-05	B3-14	163	0604, 0605, 0606, 0608
21	B5-09	B3-10	129	0601, 0301
22	B5-09	B3-08	129	0304

4.2.6.3 Determinación de los alelos HLA-DR3 y HLA DR4

La identificación de los alelos DR3 y DR4 se realizó con iniciadores específicos para cada uno en reacciones diferentes descritos por Olerup y cols.⁴⁸. Cada reacción cuenta con un par de iniciadores adicionales para co-amplificar el gen de la β -globina con DR3 y el gen de fibrosis quística con DR4 como controles internos, la amplificación en cada una de las PCRs nos indican la presencia del alelo analizado, los iniciadores son los siguientes:



5' tac ttc cat aac cag gag gag a 3'

5' tgc agt tgt cca ccc g 3'

5' caa ctt cat cca cgt tca cc 3'

5' gaa gag cca agg aca ggt ac 3'

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DR4 DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

961106-99

5' ctg cac tgt gaa gct ctc ca3'

961106-100

5' ctg cac tgt gaa gct ctc ac 3'

961106-101

5' gtt tct tgg agc agg tta aac a3'

CF1

5' gtt ttc ctg gat tat gcc tgg cac3'

CF2

5' gtt ggc atg ctt tga tga cgc ttc 3'

4.2.6.3A Amplificación de HLA-DR3 y HLA-DR4

La amplificación de HLA-DR3 y DR4 se realizó bajo condiciones óptimas de reacción descritas en las tablas 17, 18, 19 y 20. Estas reacciones se realizaron a partir del DNA extraído de sangre y usando un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 17. Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DR3

Reactivo	Volumen (μ l)	[Final]
Buffer 10X	1.25	1X
950927-49 (5 μ M)	1.25	0.5 μ M
950927-50 (5 μ M)	1.25	0.5 μ M
BG1 (5 μ M)	1.25	0.5 μ M
BG2 (5 μ M)	1.25	0.5 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	0.75	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	0.25	0.2 mM
Agua	3.45	-
Taq DNA pol (5U/ μ l)	0.3	0.12 U/ μ l
DNA	1.5	(100 ng/ μ l)
Vol. Total	12.5	-

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 18. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DR3

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94 ^o C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94 ^o C	1 min	Desnaturalización
2	58 ^o C	1 min	Apareamiento
3	72 ^o C	1 min	Extensión
4	Repetir desde el paso 2,	30 veces	
5	72 ^o C	5 min	Extensión final

Tabla 19. Condiciones de reacción para la amplificación de HLA-DR4

Reactivo	Volumen (μ l)	[Final]
Buffer 10X	1.25	1X
961106-99 (5 μ M)	1.25	0.5 μ M
961106-100 (5 μ M)	1.25	0.5 μ M
961106-101 (5 μ M)	1.25	0.5 μ M
CF1 (5 μ M)	1.25	0.5 μ M
CF2 (5 μ M)	1.25	0.5 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	0.75	1.5 mM
dNTPs (10 mM)	0.25	0.2 mM
Agua	2.2	-
Taq DNA pol (5U/ μ l)	0.3	0.12 U/ μ l
DNA	1.5	(100 ng/ μ l)
Vol. Total	12.5	-

Tabla 20. Condiciones del programa para la amplificación de HLA-DR4

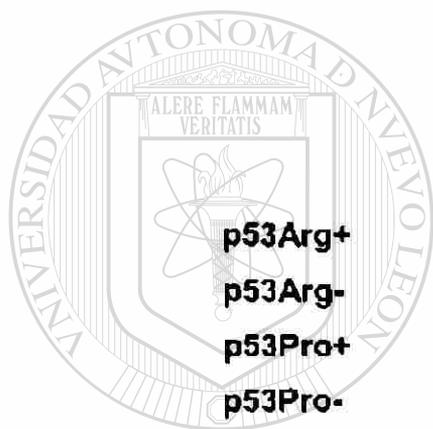
Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	1 min	Desnaturalización
2	62°C	1 min	Apareamiento
3	72°C	1 min	Extensión
4	Repetir desde el paso 2, 30 veces		
5	72°C	5 min	Extensión final

4.2.6.3B Verificación de los productos amplificados

Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue pUC18 digerido con *Afu* I.

4.2.6.4 Identificación del polimorfismo de p53

La identificación del polimorfismo se realizó mediante la PCR utilizando 2 pares de iniciadores, cada uno específico para detectar un polimorfismo en el codón 72 del gen p53 (codificante para arginina -Arg- o para prolina -Pro-) descritos por Storey y cols.⁵⁶:



5' tcc ccc ttg ccg tcc caa3'

5' ctg gtg cag ggg cca cgc 3'

5' gcc aga ggc tgc tcc ccc 3'

5' cgt gca agt cac aga ctt 3'

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.6.4A Amplificación del polimorfismo p53

La amplificación del polimorfismo del codón 72 del gen p53 se realizó bajo condiciones óptimas de reacción descritas en las tablas 21 y 22. Esta reacción se realizó a partir del DNA extraído de sangre y usando un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 21.
Condiciones de reacción para la amplificación del codón 72 de p53

Reactivo	Volumen (μ l)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
p53Arg+ (5 μ M)	0.6	0.15 μ M
p53Arg- (5 μ M)	0.6	0.15 μ M
p53Pro+ (5 μ M)	4	1 μ M
p53Pro- (5 μ M)	4	1 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	0.8	1 mM
dNTPs (10 mM)	0.75	0.375 mM
Agua	5.45	-
Taq DNA pol (5U/ μ l)	0.3	0.075 U/ μ l
DNA	1.5	(100 ng/ μ l)
Vol. Total	20	-

Tabla 22. Condiciones del programa para la amplificación del codón 72 de p53

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	30 seg	Desnaturalización
2	55°C	40 seg	Apareamiento
3	72°C	50 seg	Extensión
4	Repetir desde el paso 2, 28 veces		
5	72°C	5 min	Extensión final

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.6.4B Verificación de los productos amplificados

Los productos amplificados se resolvieron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 12%. Se utilizó una cámara de electroforesis vertical de 20X20 cms con peine de teflón de 20 carriles y 0.4mm de espesor. Los vidrios utilizados se lavaron perfectamente con jabón, agua destilada y etanol. Una vez secos, se acomodaron los vidrios y los separadores y se sellaron los lados con cinta plástica. Se preparó la mezcla descrita en la tabla 23, se vació y

se dejó polimerizar. Se colocaron 10 μ l de producto amplificado y 2 μ l de jugo azul al 6X en cada carril, se colocó como referencia el marcador de peso molecular pUC18 digerido con *Hae* III. La electroforesis se realizó con TBE 1X y se corrió por espacio de 3 h a 170V. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio 2 μ g/ml y se observaron en el equipo de fotodocumentación Gel Doc 1000.

Tabla 23. Mezcla para preparar los geles de poliacrilamida al 12%.

Reactivo	Volumen (ml)
Agua destilada	15
TBE 10X	3
Acrilamida/bisacrilamida al 30%	12
*Persulfato de amonio al 10%	0.5
*TEMED	0.05

* Catalizadores (se agregan justo antes de vaciar el gel en el molde pues desencadenan la polimerización súbita del gel).

4.2.6.5 Detección de mutaciones en los codones 12 y 13 de K-ras

La detección de mutación en los codones 12 y 13 se realizó utilizando la técnica de RFLPs. Esta técnica está basada principalmente en 2 procesos: amplificación de los codones mediante una variante de la PCR que hace uso de oligonucleótidos que incorporan sustituciones estratégicas para crear sitios de restricción al nivel de los codones 12 y 13 y digestión de los productos amplificados con las enzimas de restricción para las cuales se creó el sitio. En ambos casos, la mutación está presente cuando se detecta la pérdida de dicho sitio artificial de restricción diagnóstico en el codón en cuestión, a causa de la presencia de una mutación activadora del proto-oncogen. Los oligos utilizados fueron descritos por Shibata y Kumar y cols.^{89, 90} y la secuencia se describe a continuación:

Codón 12

961107-103 5' tat aaa ctt gtg gta gtt gga cct 3'
 961107-106 5' t cta ttg ttg gat cat at 3'

Codón 13

961106-102 5' gcc tgc tga aaa tga ctg aa 3'
 961108-108 5' cgt caa ggc act ctt gcc tag g 3'

4.2.6.5A Amplificación de los codones 12 y 13 de K-ras

Para la amplificación de los codones 12 y 13, las condiciones de reacción utilizadas fueron las descritas a continuación en la tabla 24 y 25. Estas amplificaciones se realizaron a partir del DNA extraído de las biopsias de cérvix y en un termociclador Omni-E Haydbaid.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 24.

Condiciones de reacción para la amplificación de los codones 12 y 13 de k-ras

Reactivo	Volumen (µl)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
103 ó 102 (5 µM)	4	1 µM
106 ó 108 (5 µM)	4	1 µM
MgCl ₂ (25 mM)	1.5	1.875 mM
dNTPs (10 mM)	0.4	0.2 mM
Agua	6.1	-
Taq DNA pol (5U/µl)	0.5	0.125 U/µl
DNA	1.5	(100 ng/µl)
Vol. Total	20	-

Tabla 25. Condiciones del programa para la amplificación de los codones 12 y 13 de k-ras

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	30 seg	Desnaturalización
2	*52 ó **55°C	30 seg	Apareamiento
3	72°C	30 seg	Extensión
4	Repetir desde el paso 2,	28 veces	
5	72°C	5 min	Extensión final

*Temperatura para PCR del codón 12

** Temperatura para PCR codón 13

4.2.6.5B Verificación de los productos amplificados

Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue pUC18 digerido con *Afu* I.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.6.5C Digestión con enzimas de restricción

Después de verificar la amplificación, se digirió una alícuota de 10 µl del producto amplificado con las enzima *Bst* NI para buscar la presencia o ausencia de mutación en el codón 12 y con *Hae* III en el caso del codón 13. Las digestiones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.6.5D Resolución de los productos de digestión

Los productos amplificados se resolvieron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 12% como se describe en apartado 4.2.6.4B.

4.2.6.6 Detección de mutaciones en el codón 12 de H-ras

En este caso, también se utilizó la técnica de RFLP's, usando los iniciadores descritos por Wong y cols.⁹¹. La presencia o ausencia de la mutación está dada por los diferentes tamaños de fragmentos de restricción (secuencia normal = 25, 55 y 236 pb y secuencia mutada = 21 y 291 pb). A continuación se describen los oligos utilizados:

12Hras-1

5' tta tgg ttg ctg aga aca gat ggg 3'

12Hras-2

5' ggg tgc tga gac gag gga ct 3'

4.2.6.6A Amplificación del codón 12 de H-ras

Para la amplificación del codón 12, las condiciones de reacción utilizadas fueron las descritas a continuación en las tablas 26 y 27. Estas amplificaciones se realizaron a partir del DNA extraído de las biopsias de cérvix y en un termociclador Omni-E Hydbaid.

Tabla 26. Condiciones de reacción para la amplificación del codón 12 de H-ras

Reactivo	Volumen (μ l)	[Final]
Buffer 10X	2	1X
12Hras-1 (5 μ M)	3	0.75 μ M
12Hras-2 (5 μ M)	3	0.75 μ M
MgCl ₂ (25 mM)	1.75	2.875 mM
dNTPs (10 mM)	1.25	0.625 mM
Agua	7.2	-
Taq DNA pol (5U/ μ l)	0.3	0.075 U/ μ l
DNA	1.5	(100 ng/ μ l)
Vol. Total	20	-

Tabla 27. Condiciones del programa para la amplificación del codón 12 de H-ras

Paso	Temperatura	Tiempo	Evento
1	94°C	5 min	Desnaturalización inicial
2	94°C	1 min	Desnaturalización
2	54°C	1 min	Apareamiento
3	72°C	1 min	Extensión
4	Repetir desde el paso 2.	30 veces	
5	72°C	10 min	Extensión final

4.2.6.6B Verificación de los productos amplificados

Se verificó la amplificación de las muestras mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% como se describe en el apartado 4.2.5.1B y el marcador de peso molecular utilizado fue pBS digerido con *Hae* III.

4.2.6.6C Digestión con enzimas de restricción

Después de verificar la amplificación, se digirió una alícuota de 10 μ l del producto amplificado con la enzima *Msp* I para buscar la presencia o ausencia de mutación. Las digestiones se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.2.6.6D Resolución de los productos de digestión

Los productos amplificados se resolvieron mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 12% como se describe en apartado 4.2.8.4B.

4.2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis se realizó haciendo comparaciones estadísticas utilizando tablas de contingencia de 2X2 ó 2X3 según fue el caso y se utilizó el exact tests (1,000 simulations), tomándose como significancia una $p < 0.05^{92}$.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 DATOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Se recolectaron 185 biopsias de pacientes a las cuales se les realizó histerectomía. Ochenta y cinco de las muestras tuvieron diagnóstico histopatológico confirmatorio de CaCU, las cuales constituyeron el grupo de casos, cien biopsias de pacientes sin CaCU, las cuales formaron parte del grupo control; ambos grupos se analizaron por igual. También se recolectó sangre periférica de 68 pacientes de los casos y de 87 pacientes del grupo control. De las muestras de CaCU, 46 presentaban cáncer invasor y 39 estaban en etapa de *in situ* (NIC III). El diagnóstico histopatológico reveló que 43 (93%) eran tipo escamoso y sólo 3 (7%) eran adenocarcinomas, el grado de diferenciación y de invasión para cada uno de los cánceres invasores se muestran en las tablas 28 y 29.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 28. Grado de diferenciación de los CaCU

Diferenciación	N
Bien diferenciado	2
Moderadamente diferenciado	41
Poco diferenciado	3
Total	46

Tabla 29. Grado de Invasión de los CaCU

Grado	N
Ia	3
Ib	14
IIa	1
IIb	5
IIIb	23
Total	46

La edad de las pacientes y los antecedentes gineco-obstétricos de cada una de las pacientes se analizaron y se muestran en la tabla 30, no se observó diferencia significativa al comparar los casos vs controles ($p > 0.05$). En el cuestionario realizado a cada una de las pacientes se les preguntó si habían tenido el hábito de fumar, así como el uso de anticonceptivos hormonales (tabla 31).

Tabla 30. Características de la población

	Rango		Media		DS	
	Casos	Controles	Casos	Controles	Casos	Controles
Edad (años)	16-78	27-69	45.14	43.95	13.97	8.30
Gestas	0-13	0-13	5.61	4.16	3.38	2.72
Paridad	0-12	0-11	4.74	3.12	3.26	2.75
IVSA (años)	VSAN-33	VSAN-43	16.88	19.69	4.24	6.14
CS	0-15	0-4	1.76	1.22	1.93	0.56

DS= Desviación Estandard, IVSA= Inicio de la Vida Sexual Activa, CS= Compañeros Sexuales, VSAN= Vida Sexual Activa Negada

Tabla 31. Antecedentes de la Población

Antecedentes	Casos (%) N = 170	Controles (%) N = 200
Tabaquismo	20 (23.5)	18 (18)
Uso de AO	10 (11.8)	16 (16)

p>0.05, AO= Anticonceptivos orales

5.2 DATOS DE GENÉTICA MOLECULAR

5.2.1 BANCO DE DNA GENÓMICO

Se extrajo DNA genómico a partir de las 185 muestras de tejido cervical. Dichos DNAs se integraron en un banco (85 casos y 100 controles). Estas muestras tuvieron una concentración que osciló entre 25 y 500 ng/ μ l, mientras que el volumen fue entre 20 y 500 μ l. La integridad del DNA en las muestras fue aceptable, ya que sólo en algunas cuantas se observó una ligera degradación del DNA. Además del DNA extraído de tejido fresco, se realizó la extracción de DNA a partir de 155 muestras de sangre periférica (68 casos y 87 controles) y se integró un banco en el cual la calidad del DNA es mucho mejor que en el extraído a partir de tejido, pues no se observó ninguna degradación. Las concentraciones de los DNAs están entre 100 y 1000 ng/ μ l y el volumen aproximado fue de 600 μ l por muestra. En la figura 12 se muestran algunos de los DNAs extraídos de las muestras de tejido en fresco y sangre.

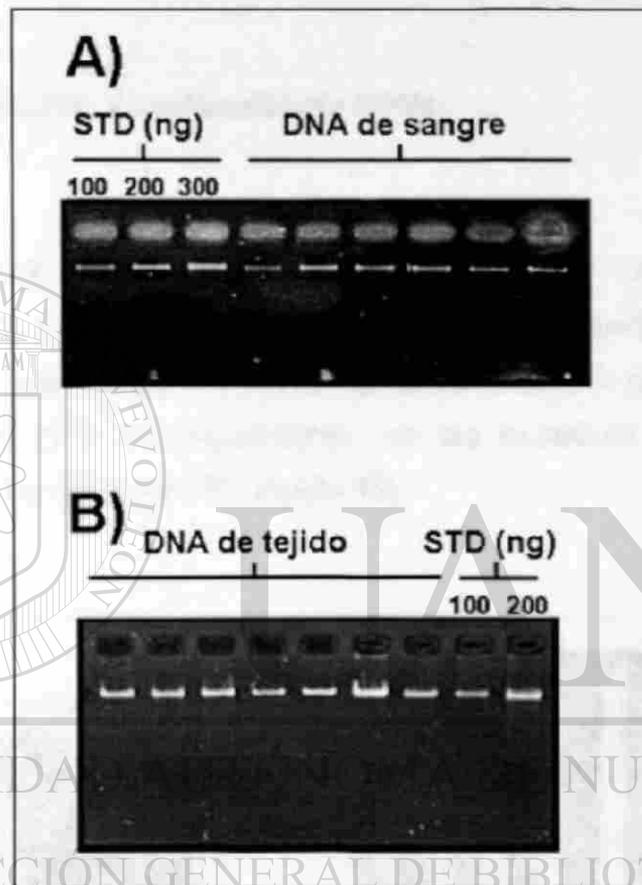


Figura 12. Análisis de DNAs en geles de agarosa al 1%. A) DNAs extraídos a partir de diferentes muestras de sangre periférica. B) DNAs correspondientes a muestras de tejido fresco (biopsia cervical). STD= DNA estándar de concentración conocida.

5.2.2.1B Frecuencia de HPV

5.2.2 FACTORES EXTRÍNSECOS

La presencia de HPV en 74/85 (87.1%) de los casos y en 4/100 (4%)

5.2.2.1 Detección y tipificación de HPV

Los pacientes en CoCU fue el tipo 16 (12.14%) También se observó la presencia de 5 (5.88%) con coinfecciones de dos tipos de HPV (16/32=2 (6.25%)

5.2.2.1A Amplificación y tipificación de HPV

Se logró la estandarización de la técnica para tipificar HPV. La amplificación del DNA genómico de las muestras de casos y controles a partir de tejido fresco (biopsia) resultó satisfactoria, lográndose la amplificación de las 185 muestras y la tipificación del HPV correspondiente, en las muestras que presentaron amplificación para el DNA de HPV (figura 13).

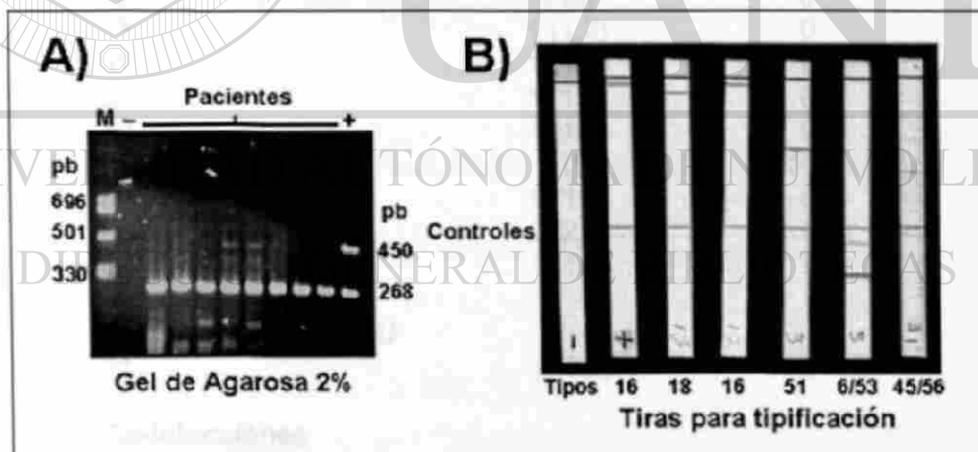


Figura 13. Amplificación y Tipificación de HPVs. A) Gel de agarosa al 2% en el cual se observan algunos de los productos amplificados a partir del DNA de tejido, la banda de 268 pb corresponde a una porción del gen de la β -globina (control interno) y la banda de 450pb corresponde a la amplificación del HPV. M: Marcador de peso molecular; -: Control negativo; +: Control positivo (muestra con HPV 16). B) Tiras para tipificar los 27 tipos de HPV, se pueden observar que las sondas del control interno están positivas en todas las muestras a excepción del control negativo; -: Control negativo; +: Control positivo (muestra con HPV 16), últimas 5 tiras corresponden a pacientes.

5.2.2.1B Frecuencia de HPVs

Se detectó la presencia de HPV en 74/85 (87.1%) de los casos y en 4/100 (4%) de los controles (tabla 32). El tipo de HPV más frecuente en CaCU fue el tipo 16 (64%) seguido del tipo 18 (12.16%). También se observó la presencia de 5 muestras (6.8%) con coinfecciones de dos tipos de HPV (16/52=2, 16/51=1, 16/58=1 y 18/68=1). Se presentaron dos coinfecciones en los controles.

Tabla 32. Frecuencia de tipos de HPVs

Tipo de HPV	Casos (%) N = 85	Controles(%) N = 100
Asociados a CaCU		
16	44 (52)	1 (1)
18	8(9)	0
45	4 (5)	0
33	1 (1.2)	0
31	1 (1.2)	0
35	1 (1.2)	0
39	1 (1.2)	0
51	4 (5)	1(1)
56	1 (1.2)	0
58	2 (2.3)	0
68	1 (1.2)	0
No asociados a CaCU		
11	1 (1.2)	0
Co-infecciones		
6/53	0	1(1)
16/52	2 (2.3)	1 (1)
16/51	1 (1.2)	0
16/58	1 (1.2)	0
18/68	1 (1.2)	0
Negativos	11 (12.9)	96 (96)

La frecuencia de HPV, de acuerdo al estadio del cáncer se muestra en la tabla 33, observándose una mayor prevalencia de HPV en los cánceres invasores. La coinfección fue similar en ambos grupos

Tabla 33. Frecuencia de HPV de acuerdo al estadio del CaCU

Tipo de HPV	CaCU <i>in situ</i> (%) N = 39	CaCU Invasor (%) N = 46
HPV	30 (76.9)	44 (95.7)
HPV 16	19/30 (63.3)	29/44 (65.9)
HPV 18	3/30 (10)	6/44 (13.6)
Coinfecciones	2/30 (6.6)	3/44 (6.8)

5.2.2.2 Integración del HPV 16

5.2.2.2A Amplificación y verificación de los productos amplificados de los genes E1 y E2

Para conocer si el DNA de HPV tipo 16 está integrado al genoma del huésped se estandarizó por separado las PCRs de los genes E1 y E2, se utilizaron oligos para amplificar el gen E6 como control interno en la amplificación de E2. Se analizaron un total de 48 casos y 1 control que contenía HPV 16, siguiendo las condiciones mencionadas en la sección de materiales y métodos y en la figura 14 se muestran los productos amplificados de algunas de las muestras.



Figura 14. Amplificación de los genes E1 y E2 del HPV 16. En ambas fotos, el gel corresponde a uno de agarosa al 1%. **A)** Amplificación del gen E1 del HPV16 (1923 pb). **B)** Coamplificación de los genes E2 y E6 del HPV 16 (1034 pb y 424 pb, respectivamente). En ambos gels la presencia de banda de amplificación nos indica la presencia del gen E1 ó E2 completos. **M:** Marcador de peso molecular; **-:** Control negativo; **+:** Control positivo; **Pa:** Pacientes.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.2.2.2B Frecuencia de integración

No se observó integración en la muestra control positiva para HPV 16. En los casos no hubo amplificación de E1 o E2 en un total de 26/48 muestras que contenían HPV 16. En 11 muestras no se logró la amplificación del gen E1, en 6 del gen E2 y en 9 ni de uno, ni de otro gen. En todas las muestras se amplificó el gen E6, usado como control interno. Basándonos en estos resultados, los casos presentaron un 54.2% de integración del HPV 16 al genoma del huésped. De 19 casos con un diagnóstico de CaCU *in situ*, 13 de las muestras estaban

integradas y 13/29 de los CaCU invasor también demostraron integración. En la figura 15 se muestra el porcentaje de integración en ambos casos.

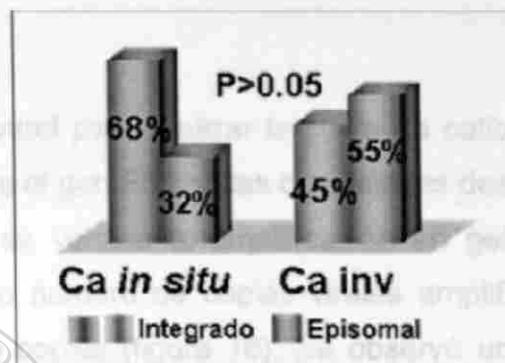


Figura 15. Integración de acuerdo al Estado del CaCU. La frecuencia de integración en los CaCU *in situ* (68%) es mayor que en los CaCU invasores (45%).

Analizando por separado las muestras con diagnóstico de CaCU invasor, no se encontró asociación entre la frecuencia de integración y el grado de invasión de las muestras. En la tabla 34 se muestran las frecuencias en cada uno de los grupos.

Tabla 34. Frecuencia de integración y grado de invasión

Grado de Invasión	Integración (%)	N
I	70	10
II	0	3
III	29	14
IV	100	2
Total (muestras HPV 16)	-----	29

5.2.2.3 Número de copias del HPV 16

5.2.2.3A Amplificación y verificación del producto amplificado del gen E6 del HPV 16

Las muestras y el control para realizar la curva de calibración se amplificaron utilizando primers para el gen E6 con las condiciones descritas en la sección de material y métodos; se verificó la amplificación en geles de agarosa al 2% (figura 16). El mínimo número de copias virales amplificadas en la curva de calibración fue de 10 copias (figura 16). Se observó una buena amplificación utilizando 100 ng de DNA genómico para cada una de las 49 muestras analizadas. Los resultados de la amplificación a partir de 10 ng de DNA genómico de muestra concordaron con las muestras que presentaban arriba de 100 copias en la amplificación a partir de 100ng de DNA.

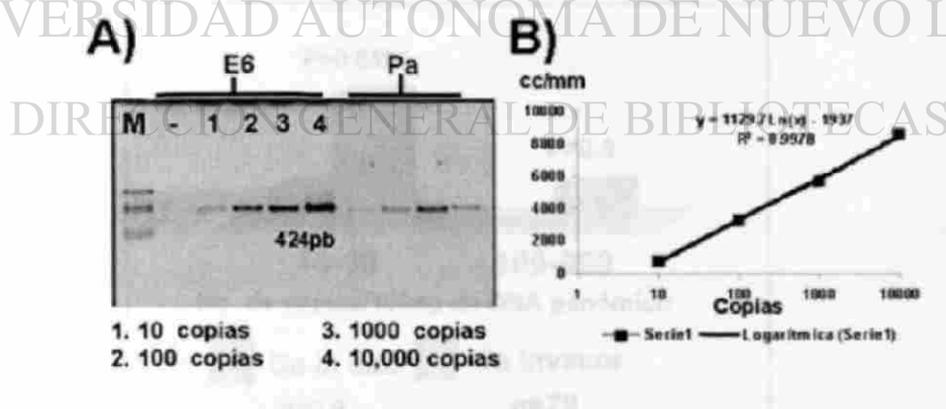


Figura 16. Amplificación del gen E6 y curva de calibración para cuantificar el número de copias de HPV-16. **A)** Gel de agarosa al 2%. Amplificación del gen E6 del HPV16 (424 pb). **M:** Marcador de peso molecular; **-:** Control negativo; **E6:** Diluciones del plásmido utilizado como control (10-10,000copias); **P:** Productos amplificados provenientes de 100ng de DNA de muestras de pacientes. **B)** Curva de calibración de los productos amplificados del gen E6 (gel A, 1-4). Se utilizó la ecuación de esta gráfica para cuantificar los productos amplificados a partir de las muestras.

5.2.2.3B Asociación del número de copias virales y características de los CaCU

No se logró amplificación de la muestra control que contenía HPV 16, debido a que la sensibilidad que nos dio la PCR fue de 10 copias mínimo, por lo que asumimos que esta muestra presenta menos de 10 copias de HPV por 100 ng de DNA genómico. De los 48 casos que tenían HPV 16, 35 (72.9%) presentaban menos de 10 copias virales, 10 (20.8%) entre 10 y 99 copias virales y 3 (6.3%) entre 100 y 999 copias virales por 100 ng de DNA genómico de muestra. En la figura 17 se muestra una gráfica comparando el número de copias virales vs estadio del cáncer. En 10 de las 29 muestras con un diagnóstico de cáncer invasor se detectaron de 10-99 copias virales/100 ng de DNA genómico, comparadas con 2/19 de los cánceres *in situ* ($p=0.0596$). Sólo en 3 muestras se detectaron de 100 a 999 copias/100 ng de DNA y éstas correspondieron al grupo de las muestras con Ca invasor.

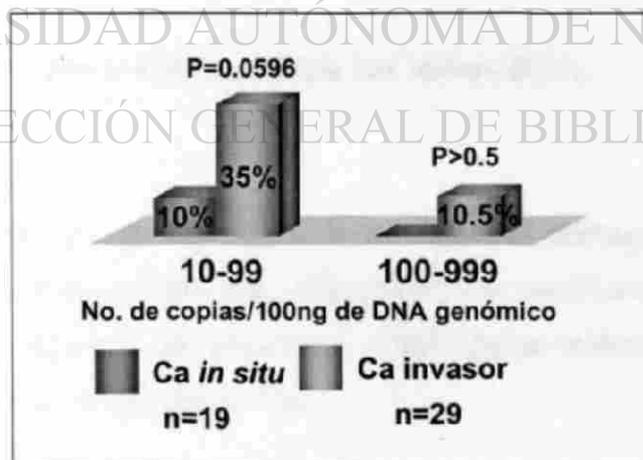


Figura 17. Frecuencia del número de copias virales/100 ng de DNA genómico vs tipo de cáncer. El 35% de las muestras con CaCU invasor presentaron de 10-99 copias/100ng de DNA y un 10.5% de 100-999 copias/100 ng de DNA genómico. Sólo un 10% de los CaCU *in situ* presentaron de 10-99 copias/100ng de DNA.

Se analizó la cantidad de copias virales encontradas por paciente en cada uno de los grados de invasión en el grupo de los CaCU invasores y los resultados se muestran en la tabla 35.

Tabla 35 No. de copias de HPV-16 de acuerdo al grado de invasión

No. de copias/100ng	Grado de invasión			
	I	II	III	IV
< 10	12	5	16	2
10-99	3	1	6	0
100-999	2	0	1	0

p>0.05

5.2.3 FACTORES INTRÍNSECOS

5.2.3.1 Determinación de los alelos DQA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

5.2.3.1A Detección y tipificación de los alelos DQA

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Habiendo recurrido en este caso a un estuche comercial, las muestras se amplificaron con las condiciones indicadas en la sección de material y métodos sin problema alguno y los productos amplificados obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 2% (figura 18).

El producto amplificado se tipificó mediante hibridación reversa en mancha. Se realizó la lectura de la tira y se determinaron los genotipos correspondientes;

todo esto también sin necesidad de cambiar el protocolo y las condiciones recomendadas por el fabricante. Es importante señalar que con el estuche empleado se pueden identificar 6 de ocho alelos de DQA, ya que los alelos 0401, 0501 y 0601 (4.2, 4.1 y 4.3) se detectan juntos como alelo 4. La combinación de los 6 alelos origina un máximo de 21 genotipos diferentes (figura 18).

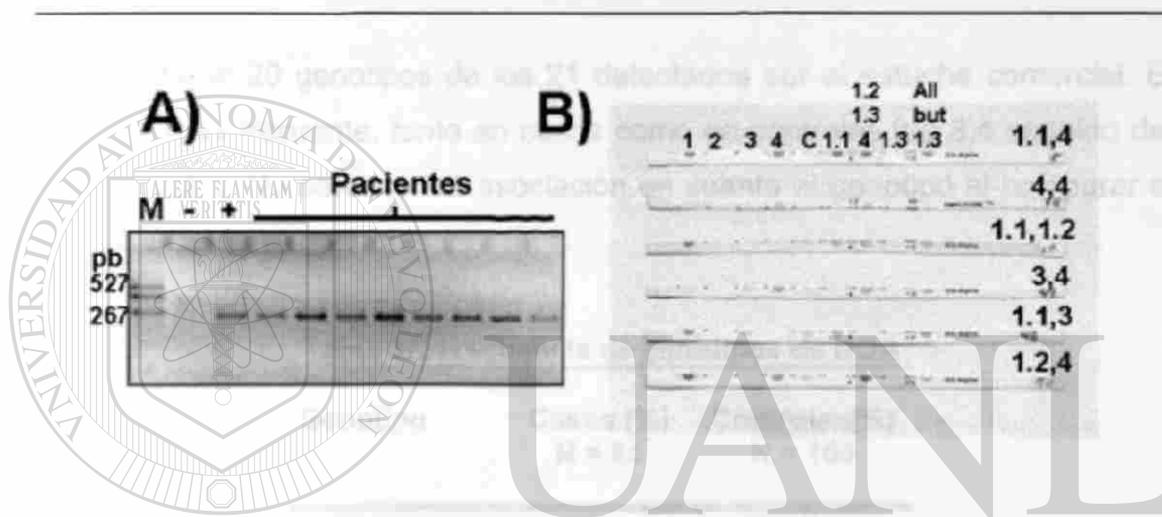


Figura 18. Tipificación con el estuche del marcador HLADQA. A) Gel de Agarosa al 2%. Productos amplificados con el estuche de algunos de los pacientes. **M:** Marcador de peso molecular; **-:** Control negativo; **+:** Control positivo. **B)** Se ilustran los resultados de la hibridación en mancha de algunos de los productos amplificados, indicándose los genotipos obtenidos para cada caso.

5.2.3.1B Frecuencia de los alelos de DQA

Se encontraron los 6 alelos detectados por el estuche comercial y la distribución se muestra en la tabla 36. El alelo más frecuente fue el 4, seguido del 3 en ambos grupos. No se encontró asociación con los alelos cuando se compararon los casos contra los controles

Tabla 36. Frecuencia de alelos de DQA

Alelos (OMS)	Casos (%) N = 170	Controles (%) N = 200
1.1 (0101)	14 (8.2)	19 (9.5)
1.2 (0102)	9 (5.3)	15 (7.5)
1.3 (0103)	5 (2.9)	10 (5)
2 (0201)	13 (7.6)	14 (7)
3 (0301)	52 (30.6)	54 (27)
4(0501,0401, 0601)*	77 (45.3)	88 (44)

p>0.05; *4.1,4.2,4.3

Se detectaron 20 genotipos de los 21 detectados por el estuche comercial. El genotipo más frecuente, tanto en casos como en controles fue 3,4 seguido del 4,4 (tabla 37). No se encontró asociación en cuanto al genotipo al comparar el grupo de casos vs controles.

Tabla 37. Frecuencia de genotipos de DQA

Genotipo	Casos (%) N = 85	Controles(%) N = 100
1.1,1.1	0	1 (1)
1.1,1.2	1 (1.1)	2 (2)
1.1,1.3	1 (1.1)	3 (3)
1.1,2	0	1 (1)
1.1,3	4 (4.8)	4 (4)
1.1,4	8 (9.3)	7 (7)
1.2,1.2	0	1(1)
1.2,1.3	0	1 (1)
1.2,2	0	1 (1)
1.2,3	1 (1.1)	3 (3)
1.2,4	7 (8.1)	6 (6)
1.3,2	1 (1.1)	2 (2)
1.3,3	1 (1.1)	2 (2)
1.3,4	2 (2.2)	2 (2)
2,2	1 (1.1)	0
2,3	3 (3.5)	1 (1)
2,4	7 (8.1)	9 (9)
3,3	7 (8.1)	9 (9)
3,4	29 (34)	27 (27)
4,4	12 (14)	18 (18)

p>0.05

5.2.3.2B Frecuencia de los alelos de DQB

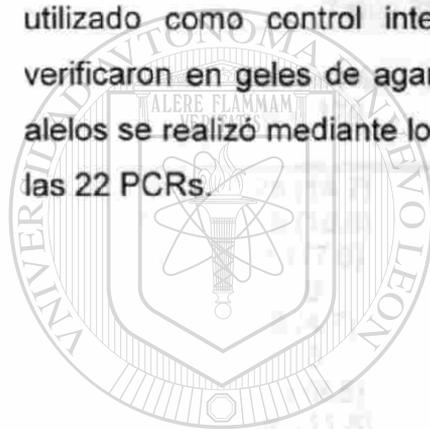
5.2.3.2 Determinación de los alelos DQB

Se analizaron 19 alelos diferentes en la población estudiada (casos y controles). Se encontró asociación entre los alelos DQB al comparar casos vs

5.2.3.2A Detección e identificación de los alelos DQB

La PCR, respectivamente. El alelo DQ2, puede considerarse como un factor protector (tabla 30).

Las muestras se amplificaron con las condiciones indicadas en la sección de material y métodos. Todas las muestras amplificaron la porción del gen DRB1 utilizado como control interno y los productos amplificados obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 3% (ver figura 19). La identificación de los alelos se realizó mediante los productos amplificados obtenidos en cada una de las 22 PCRs.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

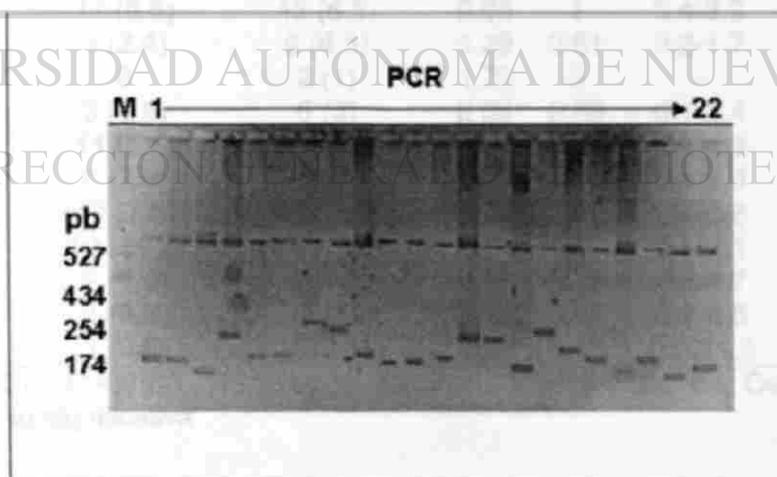


Figura 19. Amplificación de los alelos DQB. Gel de agarosa al 3%. Productos amplificados de las 22 PCRs utilizadas para la identificación de los alelos DQB. La banda de 796pb corresponde al control interno. **M:** Marcador de peso molecular.

5.2.3.2B Frecuencia de los alelos de DQB

Se detectaron 19 alelos diferentes en la población estudiada (casos y controles). Se encontró asociación entre los alelos DQB al compararse casos vs controles. Los alelos más frecuentemente encontrados fueron el 201 y 602 para casos y controles, respectivamente. El alelo 201 puede considerarse como un factor de riesgo, mientras que el alelo 602 como un factor protector (tabla 38).

Tabla 38. Frecuencia de los alelos DQB

Alelo	Casos (%) N = 170	Controles (%) N = 200	X ²	RR	IC	P
201	25 (14.7)	14 (7)	5.77	2.29	1.2-4.6	0.01
301	18 (10.6)	12 (6)	2.59	1.86	0.9-3.9	NS
302	13 (7.6)	12 (6)	0.39	1.30	0.6-2.9	NS
303	0	1 (0.5)	0.85	0	-	NS
304	8 (4.7)	7 (3.5)	0.34	1.36	0.5-3.8	NS
401	0	9 (4.5)	7.82	0	-	NS
402	15 (8.8)	24 (12)	0.98	0.71	0.4-4.1	NS
501	20 (11.8)	14 (7)	2.49	1.77	0.9-3.6	NS
502	11 (6.5)	13 (6.5)	0.00	1	0.4-2.3	NS
503	4 (2.4)	9 (4.5)	1.25	0.51	0.2-1.7	NS
504	0	2 (1)	1.70	0	-	NS
601	3 (1.8)	6 (3)	0.59	0.58	0.1-2.4	NS
602	11 (6.5)	27 (13.5)	4.91	0.44	0.2-0.9	0.027
603	6 (3.5)	6 (3)	0.08	1.18	0.4-3.8	NS
604	13 (7.6)	11 (5.5)	0.70	1.42	0.6-3.3	NS
605	19 (11.2)	21 (10.5)	0.04	1.07	0.6-2.1	NS
606	2 (1.2)	3 (1.5)	0.07	0.78	0.1-4.7	NS
607	1 (0.6)	2 (1)	0.19	0.59	0.1-6.5	NS
608	1 (0.6)	7 (3.5)	3.67	0.16	0.02-1.3	NS

P=0.01, X²=37.80. RR=Riesgo Relativo, IC=Intervalo de Confianza, NS=No significativa

Se detectaron 78 genotipos diferentes en ambos grupos, 34 en los controles y 62 en los casos (tabla 39), no se observó asociación al comparar los genotipos en los casos vs controles.

Tabla 39. Frecuencia de genotipos DQB

Genotipo	Casos N = 85	Controles N = 100	Genotipo	Casos	Controles
				N = 85	N = 100
201-201	2	0	401-501	0	1
201-301	2	0	401-602	0	2
201-302	4	2	401-604	0	1
201-402	4	4	401-605	0	2
201-501	2	1	401-608	0	1
201-502	2	1	402-402	0	1
201-503	0	1	402-501	3	2
201-601	1	0	402-502	0	5
201-602	1	1	402-503	1	1
201-603	2	0	402-601	0	1
201-604	1	1	402-602	0	1
201-605	3	0	402-603	0	1
201-608	0	3	402-604	0	1
301-301	1	2	402-605	2	2
301-302	2	0	402-606	0	1
301-304	0	1	501-502	2	0
301-402	1	0	501-503	1	4
301-501	2	1	501-601	0	1
301-502	0	1	501-602	2	2
301-503	2	0	501-603	2	0
301-602	0	5	501-604	1	1
301-604	2	0	501-605	1	0
301-605	2	0	501-606	0	1
301-606	1	0	501-607	1	0
301-608	1	0	502-502	1	2
302-302	0	1	502-601	1	0
302-304	0	2	502-604	2	0
302-401	0	1	502-605	1	1
302-402	4	2	503-604	0	1
302-502	0	1	503-605	0	1
302-605	3	2	503-606	0	1
303-402	0	1	504-504	0	1
304-304	1	0	601-605	1	0
304-401	0	1	602-602	3	0
304-501	3	0	602-604	1	0
304-502	1	0	603-603	1	0
304-602	1	2	604-604	1	0
304-603	0	1	604-605	4	0
304-606	1	0	605-605	1	0

P>0.05

Se analizaron los haplotipos DQA-DQB y se encontraron 76 diferentes (tabla 40). En los casos se detectaron 58 y 70 en los controles. Se encontró

asociación en los haplotipos DQA y DQB al comparar casos vs controles. El haplotipo 4-602 tiene un efecto protector en las mujeres contra el CaCU.

Tabla 40. Frecuencia de los haplotipos DQA-DQB

Haplotipo	Casos N = 170	Controles N = 200	Haplotipo	Casos N = 170	Controles N = 200
1.1-201	2	2	2-601	1	0
1.1-301	1	1	2-602	0	2
1.1-302	0	1	2-603	1	0
1.1-304	2	0	2-608	0	1
1.1-402	1	1	3-201	6	2
1.1-501	6	5	3-301	7	3
1.1-502	1	1	3-302	5	6
1.1-503	0	4	3-304	4	3
1.1-602	1	1	3-401	0	5
1.1-604	0	1	3-402	2	6
1.1-605	0	2	3-501	5	2
1.2-201	3	1	3-502	3	1
1.2-301	2	1	3-503	2	2
1.2-302	0	2	3-504	0	2
1.2-304	0	1	3-601	0	2
1.2-401	0	1	3-602	3	3
1.2-402	1	1	3-603	2	2
1.2-501	0	1	3-604	5	3
1.2-602	2	3	3-605	8	8
1.2-603	0	1	3-606	0	1
1.2-604	1	1	3-608	0	3
1.2-605	0	1	4-201	5	1
1.2-608	0	1	4-301	7	7
1.3-201	1	2	4-302	7	2
1.3-304	1	0	4-304	1	3
1.3-402	0	1	4-401	0	2
1.3-601	2	1	4-402	10	13
1.3-602	0	2	4-501	9	6
1.3-603	0	2	4-502	7	11
1.3-604	1	0	4-503	2	3
1.3-605	0	1	4-601	0	3
1.3-607	0	1	4-602*	5	16
2-201	8	6	4-603	3	1
2-301	1	0	4-604	6	6
2-302	1	1	4-605	11	9
2-303	0	1	4-606	2	2
2-401	0	1	4-607	1	1
2-402	1	2	4-608	1	2

$p=0.03$, $X^2=78.43$. *RR=0.35, IC=0.12-0.97, $X^2=4.39$, $p=0.0042$

5.2.3.3 Determinación de los alelos DR3 y DR4

5.2.3.3A Detección de los alelos DR3 y DR4

Las muestras se amplificaron por separado para cada uno de los alelos con las condiciones indicadas en la sección de material y métodos. Todas las muestras amplificaron la porción del gen de FQ y β -globina utilizados como controles internos, para DR4 como para DR3, procediendo tal y como se describió en el apartado 4.2.6.3. Los productos amplificados obtenidos se verificaron en geles de agarosa al 2% (figura 20).

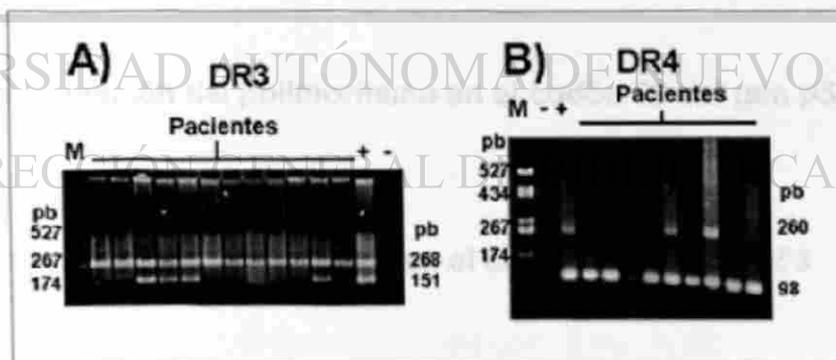


Figura 20. Amplificación de los alelos DR3 y DR4. En ambas fotos, el gel corresponde a uno de agarosa al 2%. **A)** Amplificación del alelo DR3 (151 pb) y del gen de β -globina como control interno (268 pb). **B)** Amplificación del alelo DR4 (260 pb) y del gen de la FQ como control interno (98 pb). **M:** Marcador de peso molecular; -: Control negativo; +: Control positivo.

5.2.3.3B Frecuencia de los alelos de DR3 y DR4

En la tabla 41 se muestra las frecuencias encontradas para los alelos DR3 y DR4 en nuestra población. No se encontró asociación con ninguno de los dos alelos al compararse el grupo de controles vs casos.

Tabla 41. Frecuencia de los alelos DR3 y DR4

DR3			DR4		
Alelo	Casos (%) n=85	Controles (%) n=100	Alelo	Casos (%) n=85	Controles (%) n=100
Presencia	11 (12.9)	12 (12)	Presencia	42 (49.4)	40 (49)
Ausencia	74 (87.1)	88 (88)	Ausencia	43 (50.6)	60 (60)
p>0.05			p>0.05		

5.2.3.4 Determinación del polimorfismo en el codón 72 del gen p53

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.2.3.4A Detección del polimorfismo en el codón 72 del gen p53

Se utilizaron los iniciadores descritos por Storey y cols.⁵⁵, modificando las condiciones de reacción para estandarizar una PCR dúplex y analizar ambos alelos en una misma reacción. Las condiciones utilizadas fueron las descritas en la sección de material y métodos. Los productos amplificados se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% teñidos con bromuro de etidio (figura 21).

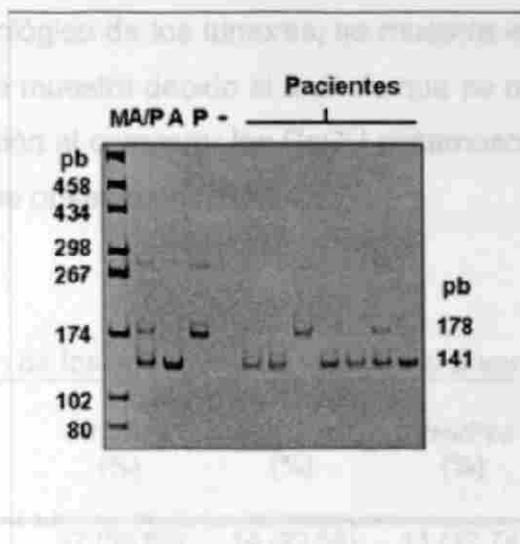


Figura 21. Amplificación de los alelos Arginina/Prolina en el codón 72 del gen p53. El gel corresponde a uno de poliacrilamida al 12%. Productos amplificados correspondientes a los alelos arginina (141 pb) y prolina (178 pb). **M:** Marcador de peso molecular; **A/P:** Heterocigoto para Arginina/Prolina; **A:** Homocigoto para Arginina, **P:** Homocigoto para Prolina; **-:** Control negativo.

5.2.3.4B Frecuencia del polimorfismo en el codón 72 del gen p53

Las frecuencias de los genotipos para el codón 72 del gen p53 se muestran en la tabla 42. No se encontró asociación entre los genotipos del polimorfismo[®] presente en el gen p53 al analizar casos vs controles.

Tabla 42. Frecuencia de los genotipos de p53

Genotipos	Casos (%) N = 85	Controles (%) N = 100
Arg/Arg	53 (62.4)	62 (62)
Arg/Pro	21 (24.7)	31 (31)
Pro/Pro	11 (12.9)	7 (7)

$p > 0.05$

El análisis de los genotipos del codón 72 del gen p53, asociándolos al diagnóstico histopatológico de los tumores, se muestra en la tabla 43 (se tomó un número menor de muestra debido al análisis que se realizó para el artículo). Se encontró asociación al comparar los CaCU escamosos HPV 16 vs controles sin HPV ($p=0.02$) y se observó un $RR=4.4$.

Tabla 43. Distribución de los genotipos de acuerdo al diagnóstico histopatológico

Diagnóstico Histopatológico	Arg/Arg (%)	Arg/Pro (%)	Pro/Pro (%)	Total	χ^2	p
CaCU (HPV)	37 (59.68)	14 (22.58)	11 (17.74)	62	3.77	0.16
Escamoso (HPV)	24 (63.16)	6 (15.79)	8 (21.05)	38	5.88	0.06
Escamoso (HPV 16)	15 (57.69)	4 (15.38)	7 (26.92)	26	7.44	0.02
Escamoso (HPV18)	2 (50.00)	1 (25.00)	1 (25.00)	4	1.49	0.53
Escamoso (sin HPV)	2 (100.00)	0	0	2	1.12	0.64
Adenocarcinoma	1 (50.00)	1 (50.00)	0	2	0.52	1.00
CaCU <i>in situ</i> (HPV)	18 (58.06)	11 (35.48)	2 (6.45)	31	0.53	0.75
(HPV 16)	8 (50.00)	6 (37.50)	2 (12.50)	16	1.15	0.65
(HPV 18)	2 (100.00)	0	0	2	1.12	0.64
Controles (HPV)	4 (80.00)	1 (20.00)	0	5	0.70	0.79
Controles (sin HPV)	58 (63.74)	26 (28.57)	7 (7.69)	91	-	-

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

5.2.3.5 Determinación de las mutaciones presentes en Ras

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.2.3.5A Detección de las mutaciones en los oncogenes K- y H-ras

Se analizaron por separado los codones 12 y 13 del oncogen K-ras y el codón 12 del oncogen H-ras utilizando las condiciones descritas en la sección de material y métodos. Los productos de las diferentes digestiones se analizaron en geles de poliacrilamida al 12% y se identificaron sin ningún problema. En las

figuras 22 y 23 se muestran los productos de digestión para la identificación de mutaciones en el oncogen K-ras y H-ras, respectivamente.

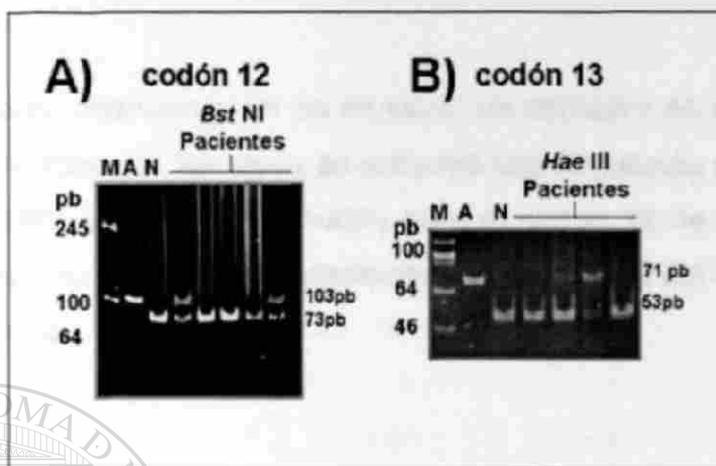


Figura 22. Detección de mutaciones en los codones 12 y 13 del oncogen K-ras. En ambas fotos, el gel corresponde a uno de poliacrilamida al 12%. **A.** El producto de la PCR (103pb) obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Bst* NI que permite evidenciar mutaciones en el codón 12. La secuencia normal generó dos fragmentos al digerirse con la enzima (73 y 20pb). **B.** El producto de la PCR (73pb) obtenido a partir de DNA de pacientes y de control, fue digerido con la enzima *Hae* III que permite evidenciar mutaciones en el codón 13. La secuencia normal generó dos fragmentos al digerirse con la enzima (53 y 20 pb).

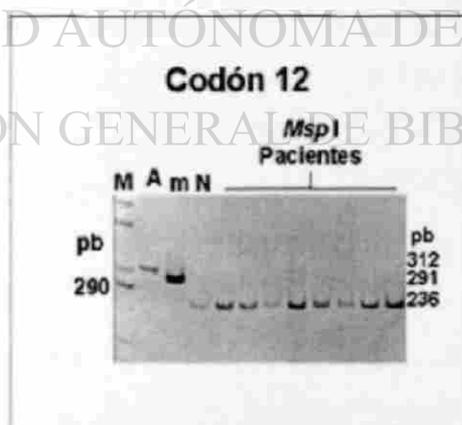
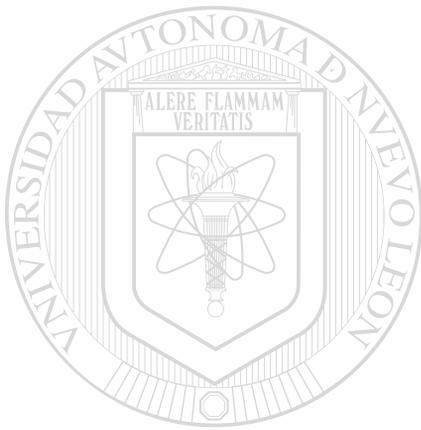


Figura 23. Detección de mutaciones en el codón 12 del oncogen H-ras. El gel corresponde a uno de poliacrilamida al 12%. El producto de la PCR, obtenido a partir de DNA de pacientes y de controles, fue digerido con la enzima *Msp* I que permite evidenciar mutaciones en el codón 12. **M:** Marcador de peso molecular; **A:** Producto sin digerir (312pb); **m:** DNA con mutación (291 y 21 pb); **N:** DNA sin mutación (236 y 55pb).

5.2.3.5B Frecuencia de mutaciones en los oncogenes Ras.

No se encontraron mutaciones en las muestras de controles en ninguno de los 3 codones analizados. En los casos se encontró una frecuencia de mutaciones de un 3.5% (3/85) y de un 12% (10/85) para el codón 12 de K-ras y H-ras respectivamente. No se encontró mutaciones en el codón 13 del oncogen K-ras en ninguna muestra.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

A pesar de los esfuerzos de los programas de detección temprana del Cáncer Cérvico-Uterino (CaCU), por diversas razones estas campañas en nuestro país no han sido muy eficaces y la enfermedad sigue siendo un importante problema de salud pública al ser la primera causa de muerte por cáncer en mujeres mexicanas. Por ello se propuso realizar este estudio, para buscar encontrar factores causales del CaCU y examinar la posible asociación de la predisposición genética en la población mexicana.

Las pacientes analizadas en este estudio fueron captadas en los departamentos de Ginecología y Oncología del Hospital Universitario "José Eleuterio González" de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. durante un período de dos años y medio y a cada una de ellas se les pidió su autorización para la toma de las muestras. Del total de las muestras recolectadas (185) se dividieron en dos grupos: 85 correspondieron al grupo de casos y 100 al grupo de controles. La edad de las pacientes en el grupo de los casos va desde los 16 hasta los 78 años mientras que en el grupo control va desde los 27 hasta los 69 años.

El diagnóstico histopatológico efectuado en el grupo de casos nos reveló que el estadio de las lesiones encontradas es muy similar, siendo de 54% para cánceres en etapa de invasor y de un 46% en etapa de *in situ*, corroborando con esto que los programas de detección temprana en nuestro país presentan fallas que no permiten detectar todos los cánceres en etapas de *in situ* cuando el pronóstico del tratamiento es mucho más alentador.

El tipo de cáncer más frecuentemente encontrado en el grupo de casos fue el carcinoma escamoso con una frecuencia (93%) muy elevada en comparación con el 75-80% reportado en la literatura para otras poblaciones¹², mientras que la frecuencia para el adenocarcinoma (7%) está ligeramente inferior (10-34%)¹².

Estudios epidemiológicos realizados en otras poblaciones han demostrado que el inicio de la actividad sexual a edades muy tempranas, así como la presencia de múltiples compañeros sexuales y un número grande de gestas y partos está asociado a un mayor riesgo de padecer CaCU^{13, 14, 15, 93}. Al comparar estos factores entre el grupo de casos y controles no se encontró diferencia significativa, concluyendo que al menos en la población analizada en este estudio, estos factores no contribuyen al riesgo de padecer CaCU.

El uso de anticonceptivos orales y el hábito de fumar en el grupo de casos y controles fue muy similar y no encontramos asociación entre estos factores y el CaCU en nuestra población, aún cuando en otros estudios se ha observado esta asociación^{13, 94, 95}.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

El HPV es el único factor que se ha demostrado como una causa del CaCU en múltiples estudios alrededor del mundo, llegándose a encontrar una prevalencia de hasta un 99%^{29, 96}. En nuestro estudio la detección de HPV se realizó utilizando un estuche que discrimina 27 tipos de HPVs (HPV Consensus PCR and Genotyping System). En nuestra población logramos detectar 15 tipos de HPVs diferentes, siendo los más frecuentes, el tipo 16 (63.5%) seguido del tipo 18 (11%), como lo son para todas las poblaciones en general. Dos de los 15 tipos de HPVs encontrados son de los no asociados al CaCU. Uno de ellos se encontró en una muestra del grupo control, sin embargo el HPV tipo11 que es

considerado como un tipo no oncogénico se encontró presente en una paciente con un diagnóstico histopatológico de CaCU *in situ*.

La prevalencia de HPV para el grupo de casos fue de 87.1%. Esta prevalencia es baja al compararla con las estadísticas obtenidas por estudios de grupos multicéntricos en los cuales se han estudiado diversas poblaciones (93-99%)^{28, 29}. Sin embargo, es ligeramente superior a la reportada con anterioridad para población mexicana, la cual varía desde un 50 hasta un 80%^{32, 33, 34}. En cuanto a la prevalencia de HPV en los controles, ésta fue de 4% y esta dentro del rango (1.5-20%), reportado en otras poblaciones⁹⁷. Sin embargo, esta prevalencia es ligeramente inferior a la reportada para la población mexicana, la cual varía desde un 5 hasta un 31%^{31, 32, 33, 34}. Es importante hacer hincapié de que las poblaciones analizadas son del centro de México. Creemos que esta variabilidad es debida a la metodología utilizada en los diversos estudios y no a las diferencias étnicas y geográficas.

En nuestro estudio encontramos en los casos un 5.9% de coinfecciones por 2 tipos de HPVs, este hallazgo ha sido reportado en diversos estudios con anterioridad^{98, 99, 100, 101, 102} y en un estudio en población mexicana, la prevalencia de coinfecciones fue de un 8.7% en cánceres invasores³⁴.

La frecuencia de HPV fue mucho más alta en los cánceres invasores (95.7%) que en los cánceres *in situ* (76.9%), como debía de esperarse. La frecuencia de HPV 16 en los CaCU invasores fue de 65.9% mientras que para los CaCU *in situ* fue de 60%, esta frecuencia es mucho más alta al compararse con el estudio realizado por Hernández-Avila y cols.³³, quienes encontraron una frecuencia de 48.8 y 48.3% de HPV 16, respectivamente.

El HPV es un agente causal del CaCU por la alta frecuencia encontrada en los casos y no en los controles, sin embargo nos queda la duda de que si los CaCU HPV negativos realmente son negativos o si pudiera existir un diagnóstico molecular más sensible para detectar el genoma viral. La presencia de DNA de HPV en las muestras de CaCU ha sido claramente asociada a esta enfermedad, sin embargo se siguen buscando mecanismos por los cuales el HPV es capaz de transformar las células. Uno de estos mecanismos es la integración del DNA viral al genoma del huésped. La integración del virus permite la sobreexpresión de las proteínas oncogénicas E6 y E7 que interactúan desregulando el ciclo celular de la célula normal. Para poder llevarse a cabo la integración del virus requiere de la ruptura de los genes E1 y E2, por lo que en este estudio analizamos la integración basándonos en este mecanismo y observamos un 54.1% de integración total en la población de casos analizados (n=48, solo se analizaron los HPV tipo 16). La frecuencia de integración del HPV en el CaCU es muy variable de acuerdo a la población analizada, así como a la metodología usada (36-91%)^{45, 59, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112}. En la población mexicana la frecuencia reportada con anterioridad de integración es de un 36% y 73%^{45, 106}.

Se ha observado que la frecuencia de integración se incrementa con el estadio de la enfermedad, ya que la frecuencia de integración en NIC es de 5-25%, mientras que en los CaCU invasores va desde 70-88% cuando se han analizado ambos tipos de muestras en un mismo estudio^{108, 109, 110, 111}. Sin embargo, nuestros resultados demuestran lo contrario, ya que en nuestra población analizada la frecuencia de integración para el CaCU *in situ* es mucho mayor (68%) que la del CaCU invasor (45%). A pesar de observarse a simple vista una diferencia grande en las frecuencias, la estadística nos demuestra que esta diferencia no es significativa, sin embargo suponemos que si aumentamos el tamaño de la muestra pudiera volverse significativa y de esta manera estaríamos de acuerdo con estudios que asumen que la integración no se

encuentra asociada al estadio de la enfermedad^{59, 112}. Al analizar estos resultados podemos concluir que la integración del HPV es una alteración genética que no se puede utilizar como marcador molecular con un valor pronóstico en la clínica de esta enfermedad.

Otro factor que se ha asociado al CaCU que es también dependiente del HPV, es la carga viral de éste, presente en el epitelio cervical. Son pocos los reportes y en la mayoría se concluye que la cantidad de virus encontrada en las muestras clínicas se incrementa al ir en aumento el estadio de los NIC^{41, 42, 43, 44}, sin embargo esta asociación no se observó en un estudio en el cual se analizaron muestras de carcinomas en diferentes estadios clínicos. En este estudio se observó una disminución en el número de copias al aumentar el estadio clínico (grado de invasión)⁴⁵. Los estudios anteriores solo han encontrado esta asociación en las muestras infectadas por el HPV tipo 16 y no con los demás tipos de HPVs oncogénicos. Es por eso que en nuestro estudio sólo se analizaron las muestras positivas para HPV16 y la cantidad de copias virales detectadas es mucho menor (1×10^2 - 9×10^3 copias/ μ g) en comparación a lo detectado por Swan y cols.⁴¹. Nuestros resultados indican que en un 90% de los CaCU *in situ* se encontraron menos de 10 copias/100ng de DNA y solo en un 10% se detectó de 10-99 copias/100ng, y en los CaCU invasores un 54.5% presentaron menos de 10 copias/100ng, un 35% de 10-99 copias/100ng y un 10.5% de 100-999 copias/100ng de DNA. Estos resultados indican que existe un mayor número de muestras con diagnóstico de CaCU invasor con mayor cantidad de número de copias virales, sin embargo no nos permiten concluir contundentemente si la carga viral es un factor de riesgo de padecer el CaCU y si afecta a la progresión de la enfermedad. En cuanto al grado de invasión en las muestras con diagnóstico de CaCU invasor, no encontramos asociación entre el número de copias y el estadio clínico como lo observó Berumen y cols.⁴⁵.

A pesar de que el HPV es un agente causal del CaCU y de todos los factores inherentes asociados a los HPVs que han sido estudiados, se siguen buscando factores que permitan la regresión de la infección por HPV ó la progresión de la infección hasta producir un cáncer. Los factores intrínsecos de cada una de las pacientes son los que más se han estudiados y entre ellos está el MHC.

En cuanto a los alelos del MHC analizados en este estudio, se lograron detectar los 6 alelos detectados para los genes HLA-DQA y 21 genotipos diferentes distribuidos entre casos y controles homogéneamente y sin observarse asociación entre los alelos y genotipos de HLA-DQA y el CaCU.

Se encontraron 19 alelos de HLA-DQB distribuidos en la población analizada y encontramos que las pacientes que presentan el alelo HLA-DQB*0201 presentan un riesgo 2.29 veces mayor de presentar CaCU. Estos resultados no están de acuerdo con lo encontrado por Helland y cols.⁵¹ en población noruega, donde se observó que el DQB*0201 está disminuido en pacientes con carcinoma de células escamosas del cérvix (SCCC). También observamos que las pacientes que presentan el alelo HLA-DQB*0602 tienen un factor protector contra el CaCU. Este alelo no ha sido anteriormente asociado al CaCU. Al analizarse los genotipos de HLA-DQB encontramos 78 genotipos diferentes distribuidos en nuestra población y no observamos asociación entre alguno de ellos y el CaCU.

Se analizaron los haplotipos DQA-DQB encontrándose 76 haplotipos diferentes y estadísticamente se demostró que las pacientes que presentan el haplotipo DQA-DQB*4-0602 presentan un factor protector. Teniendo 2.85 veces menos riesgo de presentar CaCU que las mujeres que no cuentan con este haplotipo. Este haplotipo no ha sido asociado al CaCU en otras poblaciones.

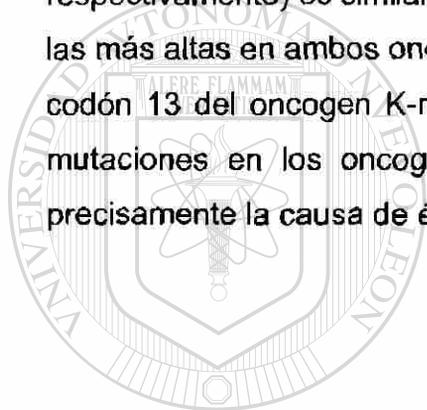
Otros alelos analizados en este estudio correspondieron a los alelos DR3 y DR4 sin encontrarse asociación con el CaCU. En un estudio previo en población mexicana se encontraron incrementadas las frecuencias de HLA-A2 y DR5, mientras que DR6, DR2 y DR1 estaban disminuidas en pacientes con CaCU, sin embargo no se analizó DR3 y DR4.

En cuanto a la susceptibilidad conferida por el MHC podemos concluir que el alelo HLA-DQB*0201 y el haplotipo DQA-DQB*4-0602 son un factor de riesgo en nuestra población, así como el alelo DQB*0602 es un factor protector.

Otro factor intrínseco ha estado en controversia desde 1998, cuando Storey y cols. asociaron el polimorfismo Arg/Arg del codón 72 del gen p53 a un riesgo mayor de padecer CaCU en pacientes infectados por HPV. El análisis de este polimorfismo en nuestro estudio no representa un factor de riesgo de padecer CaCU y estos resultados concuerdan con todos los estudios que estuvieron en contra de los resultados de Storey^{51, 58, 59, 60, 61, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72}. Sin embargo, al analizar los resultados histopatológicos de cada uno de los tumores, así como la presencia o ausencia de infección por HPV, encontramos una diferencia significativa en cuanto al polimorfismo Pro/Pro y las pacientes con CaCU de células escamosas positivos para HPV tipo 16. Esta asociación confiere un RR de 3.8 a las mujeres que presentan el polimorfismo Pro/Pro infectadas con HPV 16 de desarrollar el CaCU de células escamosas en comparación de las pacientes que presentan el polimorfismo Arg/Arg. También se encontró un RR de 4.42 al compararse con las pacientes que tienen el polimorfismo Arg/Arg+Arg/Pro. Esta asociación es muy interesante debido a que se opone a lo propuesto originalmente por Storey y cols.⁵⁵ y ya anteriormente se ha observado en otros estudios, en donde se han clasificado los tumores histopatológicamente, sin encontrarse asociación^{61, 113, 114}.

En cuanto a estos resultados es necesario tomar en cuenta los estudios realizados por Makni y Malcom y cols.^{56, 65} que sugieren que la asociación del genotipo Arg y la carcinogénesis cervical está influida por variaciones en la metodología utilizada en los diferentes laboratorios

Por último, es importante analizar los resultados obtenidos de la frecuencia de mutaciones en los oncogenes K- y H-ras que han sido asociados a diferentes tipos de cánceres y por consiguiente al CaCU. En nuestra población la frecuencia de mutaciones encontradas (3.5% y 12% en el codón 12 de K-ras y H-ras, respectivamente) es similar a las encontradas en la mayoría de los reportes (24% las más altas en ambos oncogenes)^{79, 80, 81, 82}) y encontramos mutaciones en el codón 13 del oncogen K-ras. Podemos concluir que en nuestra población las mutaciones en los oncogenes ras son un evento adicional al CaCU y no precisamente la causa de éste.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

Los hallazgos del presente trabajo, nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Se detectaron 15 tipos de HPV y el tipo más común fue el 16 (63.5%). Se detectaron coinfecciones por 2 tipos de HPVs.
2. La frecuencia de HPV para casos fue de 87% y para controles de 4%.
3. La integración de HPV 16 se presentó en igual proporción en el CaCU invasor que en el CaCU *in situ* y no se encontró asociación entre la integración del HPV-16 y el grado de invasión del CaCU.
4. El HPV-16 presenta una mayor carga viral en el CaCU invasor que en el CaCU *in situ* y no se encontró asociación entre la carga viral y el grado de invasión del CaCU.
5. No se encontró asociación entre los alelos y genotipos de DQA, genotipos de DQB y los alelos de DR3 y DR4 en nuestra población.

6. El alelo DQB*0201 es un factor de riesgo y el DQB*0602 es un factor protector en el CaCU en la población mexicana.

7. El haplotipo DQA-DQB*4-0602 es un factor protector en el CaCU en la población mexicana.

8. El polimorfismo Pro/Pro del codón 72 del gen p53 es un factor de riesgo en la pacientes HPV-16 de padecer CaCU de células escamosas.

9. La frecuencia de mutaciones en el codón 12 del oncogen H-ras en CaCU es de 12% y del oncogen K-ras es de 3.5%.

10. Los factores extrínsecos analizados en este estudio no pueden ser utilizados como marcadores moleculares para el CaCU.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

11. Los factores intrínsecos: 1) alelo DQB*0201, 2) DQB*0602, 3) haplotipo DQA-DQB*4-0602 y 4) el polimorfismo Pro/Pro del codón 72 del gen p53 pudieran ser utilizados como marcadores moleculares predictivos para el CaCU.

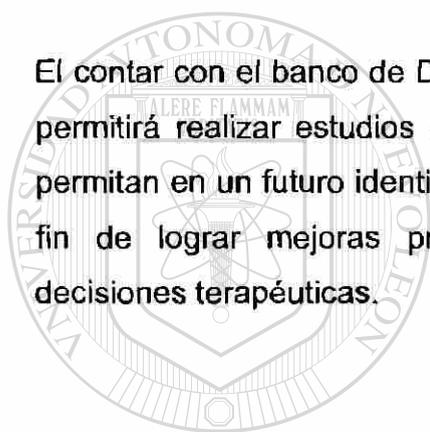
12. La información encontrada en este estudio aporta datos importantes a la epidemiología molecular del CaCU en nuestro país

CAPÍTULO VIII

PERSPECTIVAS

Analizando el trabajo en su conjunto, sus hallazgos, alcances y sus contribuciones tanto metodológicas como de carácter epidemiológico a nivel molecular, podemos plantear la siguiente perspectiva:

El contar con el banco de DNA genómico de las pacientes con y sin CaCU nos permitirá realizar estudios para analizar nuevos marcadores moleculares que permitan en un futuro identificar mujeres con riesgo de desarrollar CaCU con el fin de lograr mejoras preventivas, diagnósticas y posibles cambios en decisiones terapéuticas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



REFERENCIAS

- ¹ Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud de México (1999). Registro Histopatológico de Neoplasias en México, 15-28.
- ² Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud de México (1999). Registro Histopatológico de Neoplasias en México, 15-28.
- ³ Connie HY (1997). Fundamentals in Oncology, Part 1. section 1:11, 25-45.
- ⁴ <http://www.egap.nci.nih.gov/>. OMIM 603956.
- ⁵ De la Chapelle A, Peltomaki P (1995). Genetics of hereditary colon cancer. Annu Rev Genet 29:329-348.
- ⁶ Weinberg RA (1994). Molecular Mechanisms of Carcinogenesis. En: Leder P, Clayton DA, Rubinstein E (editores). Scientific American. Introduction to Molecular Medicine. Scientific American Inc., New York, 253-276..
- ⁷ Estadísticas Vitales (1997). Principales Causas de Mortalidad General. SSA.
- ⁸ Landis SH, Murria T, Bolden S, Wingo PA (1998). Cancer Statistics 1998. CA Cancer J Clin 48:6-29.
- ⁹ Muñoz N, Bosh X. (1996). Bulletin PAHO 30:362-377.
- ¹⁰ Restrepo H, González J, Roberts E y cols. (1987). Epidemiology and control of cancer of the cervix uterine in Latin America and Caribbean. Bol Oficina Sanit Panam 102:578-592.
- ¹¹ Cho KR (2001). Cervical Cancer. En Scriver CR, Beaudet AL, Sly W, Valle D (editores). The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease. McGraw-Hill Companies. 1105-1112.
- ¹² Tenorio-González F (2000). Cáncer invasor del cérvix. En Ahued-Ahued JR y Fernández del Castillo- C (editores). Ginecología y Obstetricia Aplicadas. JGH Editores, S.A. de C.V. 347-350.
- ¹³ Muñoz N, Bosch FX (1989). Epidemiology of cervical cancer. En Muñoz N, Bosch FX, Jensen OM (editores). Human papillomavirus and cervical cancer. Vol 94. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 9-40.

¹⁴ Schneider A, Koutsky L (1992). Epidemiology of Cervical Cancer and of HPV infection. En Muñoz N, Bosch FX, Shah KV and Meheus A (editors). *Epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer*. Vol 119. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 3-53.

¹⁵ Stern Peter L, Stanley Margaret A (1994). Human Papillomaviruses and Cervical Cancer. *Biology and Immunology* 4:72-87.

¹⁶ Schneider A 1994 Natural history of genital papillomavirus infections. *Intervirolgy* 37:201-214.

¹⁷ Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S (1994). CA Cancer J Clin 44:7-26.

¹⁸ Cho KR (1998). Cervical Cancer. En Vogelstein B, Kinzler KW (editors). *The Genetic Basis of Human Cancer*, 631-637.

¹⁹ Krebs HB (1994). Lesiones premalignas del cuello uterino. En Copeland LJ, Jarnell JF (editores). *Ginecología*, 932-960.

²⁰ Disaia PS, Creasman WT (1994). Enfermedad del cuello uterino. *Ginecología Clínica*, 1-36.

²¹ González de León C, Kudelka AP, Edwards CL, Kavanagh JJ (1993). Carcinoma of the Uterine Cervix. *Medical Oncology* 255-270.

²² Harald Sur Hausen (1991). Viruses in Human Cancers. *Science* 167:1173-1179.

²³ Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* 19:1092-1100.

²⁴ Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM (1992). Interactions of HPV E6 y E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv*, 197-217.

²⁵ Cordon-Cardo C (1995). Mutation of Cell Cycle Regulators, Biological and Clinical Implications for Human Neoplasia. *Am J Pathol*, 545-560.

²⁶ Matlashewski G (1989). The Cell Biology of Human Papillomavirus Transformed Cells. *Anticancer Research* 1447-1556.

- ²⁷ Guido M, Zamorano R, Garrido E, Gariglio P, Garcia A (1992). Early promoters of genital and cutaneous HPVs are differentially regulated by the bovine papillomavirus type 1 E2 gene product. *J General Virol* 1395-1400.
- ²⁸ Bosch FX, Manos MM, Muñoz N et al (1995). Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 87:796-802.
- ²⁹ Jacobs MV, Snijders PJ, van den Brule AJ et al (1997). A general primer GP5+/GP6(+)-mediated PCR-enzyme immunoassay method for rapid detection of 14 high-risk and 6 low-risk human papillomavirus genotypes in cervical scrapings. *J Clin Microbiol* 35:791-795.
- ³⁰ González-Garay ML, Barrera-Saldaña HA, Avilés LB, Alvarez-Salas LM, Gariglio P (1992). Prevalence in two mexican cities of human papillomavirus DNA sequences in cervical cancer. *Rev Inv Clín* 44:491-499.
- ³¹ Tamayo-Legorreta EM, Echaniz-Aviles G, Cruz-Valdez A, Camacho-Alcantara G, Calderon-Jaimes E (1993). Human papillomavirus infection in women with and without abnormal cervical cytology. *Ginecol Obstet Mex* 61:27-34.
- ³² Berumen J, Miranda EI, Zafra G, Casas L, Segura E, Ordoñez RM, Aguirre J, Martínez M, Rosas A, Ibarra V, Pedraza L, Saad A, Marroquin A, Gutiérrez M, Martínez A, Gariglio P (1997). Epidemiología molecular de cánceres de alta incidencia en México. *Gac Méd Méx*. Vol. 133; Suplemento 1:35-41.
- ³³ Hernández-Ávila M, Lazcano-Ponce EC, Berumen-Campos J, Cruz-Valdez A, Alonso de Ruiz PP, González-Lira G (1997). Human papilloma virus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: a case-control study. *Arch Med Res* 28:265-271.
- ³⁴ Torroella-Kouri M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M, Daniel RW, Ghaffari AM, Solorza G, Shah KV (1998). HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 70:115-20.
- ³⁵ Antonio V, Zamudio N, Terán MA, Jiménez MA, Flores E, Alarcón LC, Leyva MA, Illades-Aguilar B (1998). Virus del papiloma humano y lesión intraepitelial cervical: un estudio de casos y controles en el estado de Guerrero. *Memorias*

del Congreso de la Asociación Mexicana de Biología Molecular en Medicina. 01-04

³⁶ Antonio V, Zamudio N, Terán MA, Jiménez MA, Flores E, Alarcón LC, Leyva MA, Illades-Aguilar B (1998). Prevalencia de los genotipos del virus del papiloma humano en pacientes con lesiones intraepiteliales cervicales en el estado de Guerrero. Memorias del Congreso de la Asociación Mexicana de Biología Molecular en Medicina. 01N-03.

³⁷ Bello M, Cruz MR, Carrerón MA, Alarcón LC, Flores E, Leyva MA, Illades-Aguilar B (1998). Prevalencia del virus del papiloma humano en meretrices y en mujeres que asisten a la detección oportuna de cáncer cérvico uterino en el estado de Guerrero. Memorias del Congreso de la Asociación Mexicana de Biología Molecular en Medicina. PD-05.

³⁸ Jeon S, Lambert PF (1995). Integration of HPV-16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6/E7 mRNAs: implication for cervical carcinogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 92:1654-1658.

³⁹ Ocadiz R, Saucedo R, Salcedo M, Ortega V, Rodríguez H, Gordillo E, Chavez P, Gariglio P (1989). Occurrence of human papillomavirus type 16 DNA sequences and c-myc oncogene alterations in uteri-cervix carcinoma. Arch Invest Med (Mex) 20:355-362.

⁴⁰ Koopman LA, Szuhai K, van Eendenburg JD, Bezrookove V, Kenter GG, Schuurin E et al (1999). Recurrent integration of human papillomaviruses 16, 45 and 67 near translocation breakpoints in new cervical cancer cell lines. Cancer Res 59:5615-5624.

⁴¹ Swan DC, Tucker RA, Tortolero-Luna G, Mitchell MF, Wideroff L, Unger ER, Nisenbaum RA, Reeves WC, Icenogle JP (1999). Human papillomavirus (HPV) DNA copy number is dependent on grade of cervical disease and HPV type. J Clin Microbiol 37:1030-1034.

⁴² van Duin M, Sniijders PJ, Schrijnemakers F, Voehorst FJ, Rozendaal L, Nobbenhuia mA, van den Brule AJ, Verheijen RH, Helmerhorst JJ, Meijer CJ (2002). Human papillomavirus 16 load in normal y abnormal cervical scrapes : an indicator of CIN II/III and viral clearance. Int J Cancer 98 :590-595.

⁴³ Josefsson AM, Magnusson PK, Ylitalo N, Sorensen P, Qwarforth-Tubb A, Andersen PK, Melbye M, Adami HO, Gyllensten UB (2000). Viral load of human papilloma virus 16 as a determinan for development of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet* 355:2189-2193.

⁴⁴ Sun Ca, Liu JF, Wu DM, Nieh S, Yu CP, Chu TY (2002). Viral Load of high-risk human papillomavirus in cervical squamous intraepithelial lesions. *Int J Gynecol Obstet* 76:41-47.

⁴⁵ Berumen J, Casas L, Segura E, Amezcua JL, García-Carranca A (1994). Genome amplification of Human Papillomavirus type 16 and 18 in cervical carcinomas is related to the retention of E1/E2 genes. *Int J Cancer* 56:640-645.

⁴⁶ Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Köel H, Kupsch E, Glaubitz M, Niesert S, Kuhnle H, Schedel I (1994). Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer* 57: 836-840.

⁴⁷ Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, Brown DR (2001). Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J of Medical Virology* 64:550-559.

⁴⁸ Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS (2001). *Inmunología Celular y Molecular*. Capítulo 5. El complejo principal de Histocompatibilidad. 104-123.

⁴⁹ Helland A, Borresen AL, Kristensen G, Ronningen KS (1994). DQA1 and DQB1 genes in patients with squamous cell carcinoma of the cervix: relationship to human papillomavirus infection and prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3:479-486.

⁵⁰ Montoya L, Saiz I, Rey G, Vela F, Clerici-Larradet N (1998). Cervical carcinoma: human papillomavirus infection and HLA-associated risk factors in the Spanish population. *Eur J Immunogenet* 25:329-337.

⁵¹ Helland A, Olsen AO, Gjoen K, Akselsen HE, Sauer T, Magnus P, Borresen-Dale AL, Ronningen KS (1998). An increased risk of cervical intra-epithelial neoplasia grade II-III among human papillomavirus positive patients with the HLA-DQA1*0102-DQB1*0602 haplotype: A population-based case-control study of Norwegian women. *Int J Cancer* 79:19-24.

⁵² Apple RJ, Erlich HA, Klintz W, Manos MM, Becker TM, Wheeler CM (1994). HLA DR-DQ associations with cervical carcinoma show papillomavirus-type specificity. *Nature Genetics* 6:157-162.

⁵³ Ferrera A, Olivo A, Alaez C, Melchers WJG, Gorodezky C (1999). HLA DQA1 and DQB1 loci in Honduran women with cervical dysplasia and invasive cervical carcinoma and their relationship to human papillomavirus infection. *Human Biology* 71:367-379.

⁵⁴ Silva B, Vargas-Alarcon G, Zuñiga-Ramos J, Rodriguez-Reyna TS, Hernandez-Martinez B, Osnaya N, Kofman S, Torres-Lobaton A, Gran J (1999). Genetic features of Mexican women predisposing to cancer of the uterine cervix. *Hum Pathol* 30:626-628.

⁵⁵ Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol d, Mantovani F, Breuer J, Leigh IM, Matlashewski G, Banks L (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* 393:229-234.

⁵⁶ Makni H, Franco EL, Kaiano J, Villa LL, Labrecque S, Dudley R, Storey A, Matlashewski G (2000). P53 polymorphism in codon 72 and risk of human papillomavirus-induced cervical cancer: effect of inter-laboratory variation. *Int J Cancer* 87:528-533.

⁵⁷ Zhbe I, Voglino G, Wilander E, Delius H, Marongiu A, Edler L, Klimek F, Andersson S, Tommasino M (2001). p53 codon 72 polymorphism and various human papillomavirus 16 E6 genotypes are risk factors for cervical cancer development. *Cancer Res* 61:608-615.

⁵⁸ Szarka K, Veress G, Kónya J, Gergely L (1999). Frequency of p53 codon 72 genotypes in human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and cervical cancer. *Anticancer Res* 19:2377-2382.

⁵⁹ Szarka K, Veress G, Juhasz A, Konya J, Sapy T, Soos G, Hernadi Z, Gergely L (2000). Integration status of virus DNA and p53 codon 72 polymorphism in human papillomavirus type 16 positive cervical cancers. *Anticancer Res* 20:2161-2167.

⁶⁰ Bertorelle R, Chieco-Bianchi L, Del Mistro A (1999). Papillomavirus and p53 codon 72 polymorphism. *Int J Cancer* 82:616- 620.

- ⁶¹ Giannoudis A, Graham DA, Southern SA, Herrington CS (1999). P53 codon 72 Arg/Pro polymorphism is not related to HPV type or lesion grade in low- and high-grade squamous carcinoma of the cervix. *Int J Cancer* 83:66-71.
- ⁶² Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale AL (1998). p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature* 396:530-536.
- ⁶³ Josefsson AM, Manusson PKE, Ylitalo N, Quarforth-Tubbin P, Pontén Jan, Adami HO, Gyllensen UB (1998). p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature* 396:531-535.
- ⁶⁴ Hayes VM, Hofstra RMW, Buys CHCM, Holleman H, van der Zee AGJ (1998). Homozygous arginine-72 in wild type p53 and risk of cervical cancer. *Lancet* 353:1756-1762.
- ⁶⁵ Malcom EK, Baber GB, Boyd JC, Stoler MH (2000). Polymorphism at codón 72 of p53 is not associated with cervical cancer risk. *Mol Pathol* 13:373-378.
- ⁶⁶ Ngan HY, Liu VW, Liu SS (1999). Risk of cervical cancer is not increased in Chinese carrying homozygous arginine at codon 72 of p53. *Br J Cancer* 80:1828-1832.
- ⁶⁷ Minaguchi T, Kanamori Y, Matsushima M, Yoshikawa H, Taketani Y, Nakamura Y (1998). No evidence of correlation between polymorphism at codon 72 of p53 and risk of cervical cancer in Japanese patients with human papillomavirus 16/18 infection. *Cancer Research* 58:4585-4590.
- ⁶⁸ Yamashita T, Yaginuma Y, Saitoh Y, Kawai K, Kurakane T, Hayashi H, Ishikawa M (1999). Codon 72 polymorphism of p53 as a risk factor for patients with human papillomavirus-associated squamous intraepithelial lesions and invasive cancer of the uterine cervix. *Carcinogenesis* 20:1733-1736.
- ⁶⁹ Wang NM, Tsai CH, Yeh KT, Chen SJ, Chang JG (1999). P53 codon 72Arg polymorphism is not a risk factor for carcinogenesis in the Chinese. *Int J Mol Med* 4:249-253.
- ⁷⁰ Klaes R, Ridder R, Schaefer U, Benner A, von Knebel Doeberitz M (1999). No evidence of p53 allele-specific predisposition in human papillomavirus-associated cervical cancer. *J Mol Med* 77:299-303.

⁷¹ Rosenthal AN, Ryan A, Al-Jehani RM, Storey A, Harwood CA, Jacobs IJ (1998). p53 codon 72 polymorphism and risk of cervical cancer in UK. *Lancet* 352:871-874.

⁷² Hildesheim A, Schiffman M, Brinton LA, Fraumeni JF Jr, Herrero R, Bratti MC, Schwartz P, Mortel R, Barnes W, Greenberg M, McGowan L, Scott DR, Martin M, Herrera JE, Carrington M (1998). p53 polymorphism and risk of cervical cancer. *Nature* 396:531-534.

⁷³ Matlashewski G (1989). The Cell Biology of Human Papillomavirus Transformed Cells. *Anticancer Research* 9:1447-1556.

⁷⁴ Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM (1992). Interactions of HPV E6 y E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. *Cancer Surv* 12:97-217.

⁷⁵ McCormick F (1989). Ras oncogenes, in *Oncogenes and Molecular Origins of Cancer*. Winberg R (editor), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY Pag. 125-145.

⁷⁶ Bos JL (1989). Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49:4682-46897.

⁷⁷ Martínez-Garza SG, Núñez-Salazar AJ, Calderón-Garcidueñas AL, Bosques-Padilla FJ, Niderhauser-García A, Barrera-Saldaña HA (1999). Frequency and clinicopathology associations of K-ras mutations in colorectal cancer in a northeast Mexican population. *Dig Dis* 17:225-229.

⁷⁸ Wong YF, Chung TKH, Cheung TH, Lam SK, Xu YG, Chang AMZ (1995). Frequent ras gene mutations in squamous cell cervical cancer. *Cancer Letters* 95:29-32.

⁷⁹ O'Leary JJ, Landers RJ, Silva I, Uhlmann V, Crowley M, Healy I, Luttich K (1998). Molecular analysis of ras oncogenes in CIN III and in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 51:576-82.

⁸⁰ Lee JH, Lee SK, Yang MH, Ahmed MM, Mohiuddin M, Lee EY (1996). Expression and mutation of H-ras in uterine cervical cancer. *Gynecol Oncol* 62:49-54.

- ⁸¹ Grendys EC Jr, Barnes WA, Weitzel J, Sparkowski J, Schlegel R (1997). Identification of H, K, and N-ras point mutations ins stage IB cervical cancer. *Gynecol Oncol* 65:343-347.
- ⁸² Riou G, Barrois M, Sheng ZM, Duvillard P, Lhomme C (1988). Somatic deletions and mutations of c-Ha-ras gene in human cervical cancers. *Oncogene* 3:329-333.
- ⁸³ FIGO Shepherd JH. (1996). Cervical and vulva cancer : changes in FIGO definitions of staging. *Br J Obstet Gynaecol* 103:405.
- ⁸⁴ Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.
- ⁸⁵ Tyan YS (1993). Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in head and neck tumors. *J Clin Microbiol* 31:53-56.
- ⁸⁶ Helmuth R, Fildes N, Blake E, Luce MC, Chimera J, Madej R, Gorodezky C, Stoneking M, Schmill N, Klitz W, Higuchi R, Erlich H (1990). HLA-DQa allele and genotype frequencies in various human populations, determined by using enzymatic amplification and oligonucleotide probes. *American Journal of Human Genetics* 47:515-523.
- ⁸⁷ Olerup O, Aldener A, Fogdell A (1993). HLA-DQB1 and -DQA1 typing by PCR amplification with séquence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens* 41:119-134.
- ⁸⁸ Olerup (1992). HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours : an alternative to serological DR typing in clinical practice including conor-recipient matching in cadaveric transplatation. *Tissue Antigens* 39: 225-235.
- ⁸⁹ Shibata D, Almoguera C, Furrecter A, Dunitz J, Martin SE, Cosgrove M, Perucho M, Arnheim N (1990). Detection mutational activation of the c-K-ras gene in human pancreatic adenocarcinoma. *Balliere Clin Gastroenterol* 4:151-169.
- ⁹⁰ Kumar R, Dunn LL (1989). Designed diagnostic restriction fragment length polymorphisms for the detection of point mutation in ras oncogenes. *Oncogene Res* 4:235-241.

- ⁹¹ Wong YF, Chung TKH, Cheung TH, Lam SK, Xu YG, Chang AMZ (1995). Frequent ras gene mutations in squamous cell cervical cancer. *Cancer Letters*. 95:29-32.
- ⁹² Roff DA, Bentzen P (1989). The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphism: X^2 and the problem of small sample. *Mol Biol Evol* 6:539-545.
- ⁹³ Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, Shah KV, Meijer CJ, Bosch FX; International Agency for Research on Cancer. Multicentric Cervical Cancer Study Group (2002). Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 359:1093-1101.
- ⁹⁴ Muñoz N, Bosch FX. HPV and cervical neoplasia. Review of case-control and cohort studies (1992). *IARC Sci Publ* 19:251-261.
- ⁹⁵ Santos C, Muñoz N, Klug S, Almonte M, Guerrero I, Alvarez M, Velarde C, Galdos O, Castillo M, Walboomers J, Meijer C, Caceres E (2001). HPV types and cofactors causing cervical cancer in Peru. *Br J Cancer* 85:966-971.
- ⁹⁶ Walboomers JM, Jabos MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Muñoz N (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19.
- ⁹⁷ Prevalence (1999). En: Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A, van Ballegooijen M, van den Akker E (editors). A systematic review of the role of human papillomavirus testing within a cervical screening programme. *Health Technology Assessment* 51-62.
- ⁹⁸ Fife KH, Cramer HM, Schroeder JM, Brown DR (2001). Detection of multiple human papillomavirus types in the lower genital tract correlates with cervical dysplasia. *J of Medical Virology* 64:550-559.
- ⁹⁹ Griffin NR, Bevan IS, Lewis FA, Wells M, Young LS (1989). Demonstration of multiple HPV types in normal cervix and in cervical squamous cell carcinoma using the polymerase chain reaction on paraffin wax embedded material.
- ¹⁰⁰ Rousseau MC, Pereira JS, Prado JC, Villa LL, Rohan Te, Franco EL (2001). Cervical coinfection with human papillomavirus (HPV) types as a predictor of acquisition and persistence of HPV infection. *J Infect Dis* 184:1508-1517.

¹⁰¹ Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM (1998). Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol* 36:3020-3027.

¹⁰² Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ (2000). Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38:357-361.

¹⁰³ Kalantari M, Blennow E, Hagmar B, Johansson B (2001). Physical state of HPV 16 and chromosomal mapping of the integrated form in cervical carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 10:46-54.

¹⁰⁴ Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar G, Johansson B (1998). Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynecol Pathol* 17:146-153.

¹⁰⁵ Yoshinouchi M, Hongo A, Nakamura K, Kodama J, Itoh S, Sakai H, Kudo T (1999). Analysis by multiplex PCR of the physical status of human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers. *Journal of Clinical Microbiology* 37:3514-3517.

¹⁰⁶ Casas L, Galvan SC, Ordoñez RM, López N, Guido M, Berumen J (1999). Asian-American variants of human papillomavirus type 16 have extensive mutations in the E2 gene and are highly amplified in cervical carcinomas. *Int J Cancer* 83:449-455.

¹⁰⁷ Watts KJ, Thompson CH, Cossart YE, Rose BR (2002). Sequence variation and physical state of human papillomavirus type 16 cervical cancer isolates from Australia and New Caledonia. *Int J Cancer* 97:868-874.

¹⁰⁸ Cullen AP, Reids R, Campion M, Lorincz AT (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 65:606-612.

¹⁰⁹ Pirami L, Giache V, Becciolini A (1997). Analysis of HPV 16, 18, 31, and 35 DNA in pre-invasive and invasive lesions of the uterine cervix. *J Clin Pathol* 50:600-604.

¹¹⁰ Luft F, Klaes R, Nees M, Dürst M, Heilmann V, Melsheimer P, von Knebel Doeberitz M (2001). Detection of integrated papillomavirus sequences by ligation-mediated PCR (DIPS-PCR) and molecular characterization in cervical cancer cells. *Int J Cancer* 92:9-17.

¹¹¹ Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK (1992). Analysis by polimerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol* 73: 2327-2336.

¹¹² Vernon SD, Unger ER, Miller DL, Lee DR, Reeves WC (1997). Association of human pallomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *Int J Cancer* 74:50-56.

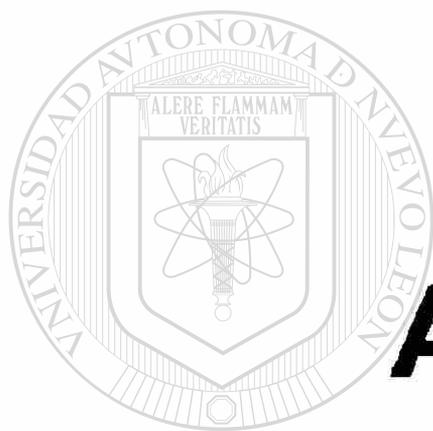
¹¹³ Madeleine MM, Shera K, Schwartz SM, Daling JR, Galloway DA, Wip Carter JJ, McKnight B, McDougall JK (2000). The p53 Arg72Pro polymorphism, human papillomavirus, and invasive squamous cell cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:225-227.

¹¹⁴ Pegoraro R, Moodley J, Naiker S, Lanning P, Rom L (2000). The p53 codon 72 polymorphism in black South African women and the risk of cervical cancer. *BJOG* 107:1164-1165.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





ANEXO I

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PROTOCOLO: ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS FACTORES EXTRÍNCECOS E INTRÍNCECOS ASOCIADOS A CÁNCER CÉRVICO-UTERINO

Clave del Paciente _____

Fecha _____

Nombre _____ N° de Expediente _____

Edad _____ años Domicilio: _____

Telefono _____

Escolaridad: _____ Ocupación _____

ANTECEDENTES HEREDO FAMILIARES

Antecedentes de Cáncer | SI | | NO | Quien _____ Tipo de Cáncer _____

Quien _____ Tipo de Cáncer _____ Diabetes _____

Hipertensión _____ Otras enfermedades _____

ANTECEDENTES PERSONALES NO PATOLÓGICOS

Tabaquismo | NO | | SI | N° de años _____ N° de cigarrillos /día _____

Activo | SI | Inactivo desde hace _____ Alcoholismo | NO | | SI | N° de años _____

Cantidad _____ Tipo de bebida _____ Activo | SI | Inactivo desde hace _____

ANTECEDENTES GINECO-OBSTETRICOS

Menarca _____ Regla _____ X _____ días Menopausia (año) _____ I.V.S _____ C.S. _____

Gestas _____ Partos _____ Cesareas _____ Abortos _____ Ectópicos _____

M.P.F. | SI | | NO | Tipo y tiempo de uso: Condon _____ DIU _____ OTB _____

Hormonal Oral (nombre /tiempo) _____ Hormonal Parenteral (nombre/tiempo) _____

Otros (especifique) _____

ANTECEDENTES PERSONALES PATOLÓGICOS

Enfermedad Año de Diagnóstico Tratamiento Evolución. Como fue la respuesta

Diabetes _____

Hipertensión _____

Artritis Reumat. _____

Obesidad _____

Otras _____

Enfermedades de Transmisión sexual

Papilomatosis vulvar o vaginal, condiloma acuminado o atípico, gonorrea, sífilis, chancro blando, tricomoniasis, clamidiasis, SIDA, Hepatitis B o C, vaginosis inespecífica, candidiasis.

Otras. _____

Cervicitis Crónica _____

Neoplasias Benignas _____

Historia de Citologías Cervicales

Mencionar si existe infección por HPV u otro microorganismo. HPV

Fecha _____ Resultado _____

Fecha _____ Resultado _____

Fecha _____ Resultado _____

Cáncer Cervico-Uterino.

Fecha de Diagnóstico: _____ Estadio Clínico _____

Diagnóstico de Biopsia _____

Se detecto HPV _____

TRATAMIENTO

Quirúrgico: Histerectomía /NO/ SI: _____ Fecha _____

Estadio Post-Quirúrgico _____

Reporte Histopatológico _____

Grado de Diferenciación _____

Se detecto HPV _____

No Quirúrgico: Preoperatorio /SI/NO/ --Quimioterapia/SI/ - Radioterapia/SI/

Inmunoterapia/SI/

Quimioterapia:	Druga/Fecha	Dosis/m ²	Ciclos
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

Radioterapia: Sitio _____ **Dosis Total** _____ **Nº de sesiones** _____

Pronóstico en % de sobrevida a 5 años:

EVOLUCION

Recidiva o Recurrencia /SI/NO/

Fecha	Sitio de actividad neoplasica	Tratamiento	Edo. Clínico
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____
_____	_____	_____	_____

COMENTARIOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Defunción _____ Fecha _____ Diagnósticos en el certificado _____

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Por medio de la presente hago constar que estoy informada de la realización del proyecto "**ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS FACTORES EXTRÍNSECOS E INTRÍNSECOS ASOCIADOS A CÁNCER CÉRVICO-UTERINO**", por lo cual accedo de manera voluntaria a contestar el cuestionario que me será hecho, a donar 5 ml de mi sangre y una biopsia del cérvix después de la realización de la histerectomía.

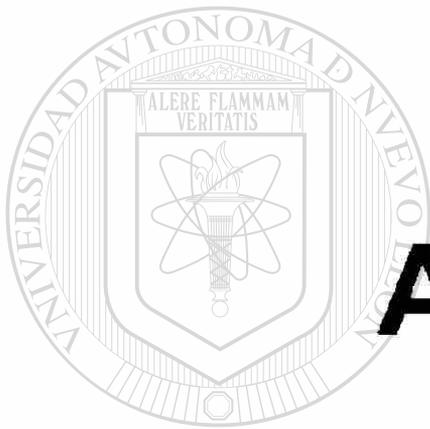
Así mismo, autorizo a las personas que realizan este proyecto a que *utilicen tanto los datos proporcionados por mi y las muestras biológicas que se obtengan de mi, para realizar las investigaciones que consideren necesarias en el entendido de que tanto los resultados como mi persona serán mantenidos en absoluta confidencialidad*

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIRMA

NOMBRE DE LA PACIENTE



ANEXO II

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

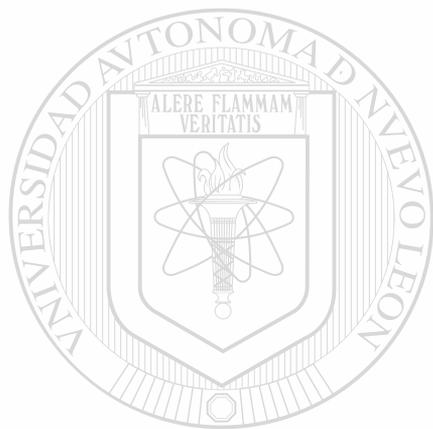
DISTINCIONES

- Segundo lugar con el trabajo "HPV y procesos moleculares en el cáncer cérvico-uterino en mujeres mexicanas" en la categoría de Trabajos de Investigación concluidos del II Concurso de Carteles Científicos en el XV Congreso Internacional de Medicina ITESM realizado en la Escuela de Medicina Ignacio A. Santos, en la Cd. de Monterrey, N.L. (Abril de 1999).
- Primer lugar con el trabajo "HPV y Polimorfismo en el Codón 72 de p53 asociado al Cáncer Cérvico-Uterino" en la categoría de Protocolos de Investigación en el III Concurso de Carteles Científicos en el XVI Congreso Internacional de Medicina ITESM realizado en la Escuela de Medicina Ignacio A. Santos, en la Cd. de Monterrey, N.L. (Abril de 2000).
- Primer lugar con el trabajo "HPV y procesos moleculares en el cáncer cérvico-uterino en mujeres mexicanas" en el XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, realizado en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., en octubre de 1999. (Mayo 2000).
- Segundo lugar con el trabajo "Detección de mutaciones en el oncogen K-ras en pacientes con cáncer cérvico-uterino" en el XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica, realizado en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., en octubre de 1999. (Mayo 2000).

CONGRESOS

- HPV y Procesos Moleculares en el cáncer cérvico-uterino en mujeres mexicanas, trabajo presentado en el XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica realizado en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., (Octubre de 1999).
- Detección de mutaciones en el oncogen K-ras en pacientes con cáncer cérvico-uterino, trabajo presentado en el XVII Congreso Nacional de Investigación Biomédica realizado en la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., (Octubre de 1999).
- HPV y polimorfismo del codón 72 del gen p53 en cáncer cérvico-uterino en población del noreste de México, trabajo presentado en el XXIV Congreso Nacional de Genética Humana, realizado en la Cd. de Zacatecas, Zac. (Octubre de 1999).
- Asociación de los alelos DR3, DR4 y cáncer cérvico-uterino en la población mexicana, trabajo presentado en el XXIV Congreso Nacional de Genética Humana, realizado en la Cd. de Zacatecas, Zac. (Octubre de 1999).
- Detección de mutaciones en los oncogenes K- y H-ras en pacientes con Cáncer Cérvico-Uterino, trabajo presentado en el Congreso Genética y Biomedicina Molecular 2000, realizado en la Cd. de Monterrey, N.L. (Octubre de 2000).
- Análisis molecular de los factores extrínsecos e intrínsecos asociados a Cáncer Cérvico-Uterino en mujeres del noreste de México, trabajo presentado en el Congreso Genética y Biomedicina Molecular 2000, realizado en la Cd. de Monterrey, N.L. (Octubre de 2000).

- **Análisis molecular de los factores extrínsecos e intrínsecos asociados a Cáncer Cérvico-Uterino, trabajo presentado en el Encuentro Estatal de Investigación, realizado por la Secretaría de Salud de Nuevo León, en la Cd. de Monterrey, N.L. (Octubre del 2000).**

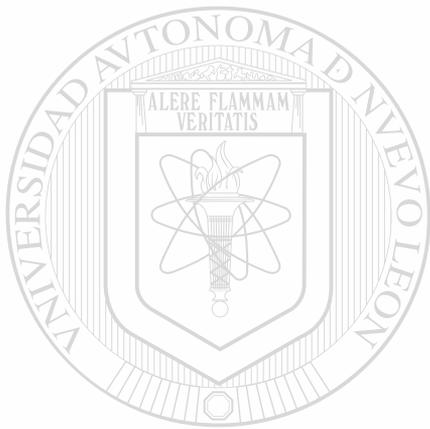


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



