

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



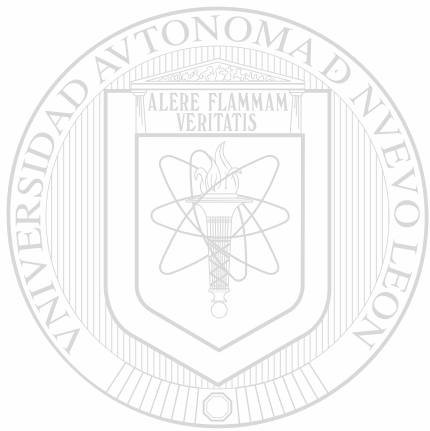
"EVALUACION DE LA VARIABILIDAD GENETICA Y
EPIGENETICA DEL HPV EN UNA POBLACION DEL
NORESTE DE MEXICO"

POR:

M. en C. ITZEL EVELYN CALLEJA MACIAS

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

Octubre, 2004



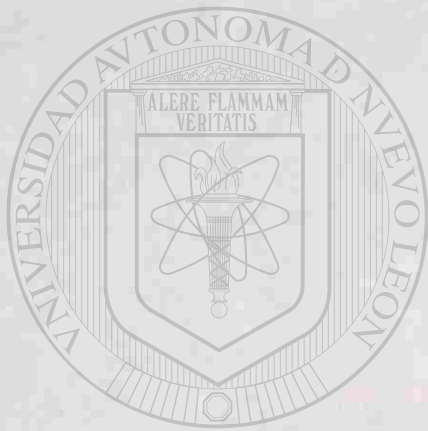
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M. en C. ITZEL EVELYN CALLEJA MACIAS

TD
RC280
.U8
C35
2004
c.1



1080126302



UANL

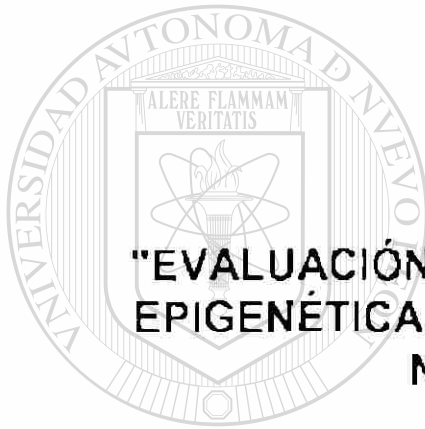
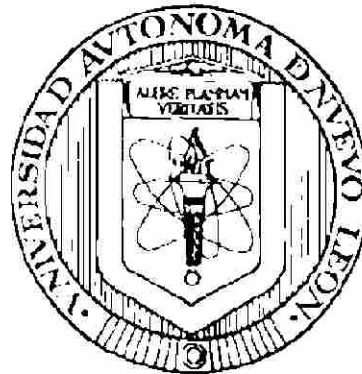
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



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

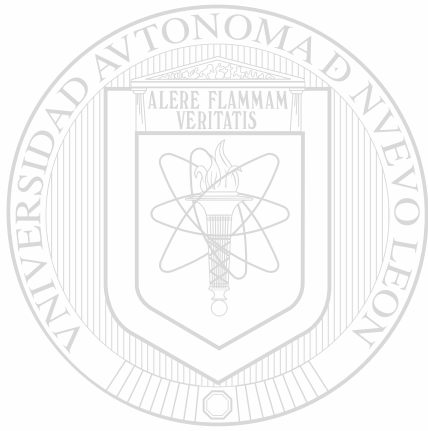
POR:

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
M. en C. ITZEL EVELYN CALLEJA MACIAS

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

Octubre, 2004

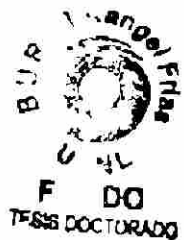



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS





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

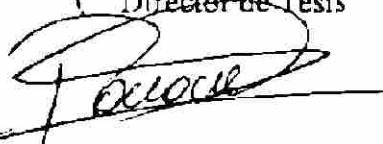
DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

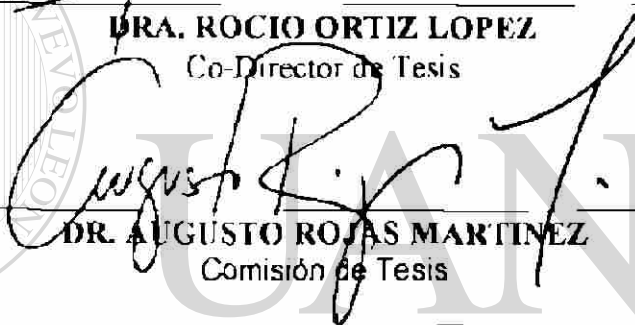
Aprobación de la Tesis:



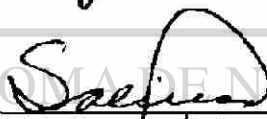
DR. HUGO ALBERTO BARRERA SALDAÑA
Director de Tesis



DRA. ROCIO ORTIZ LOPEZ
Co-Director de Tesis



DR. AUGUSTO ROJAS MARTINEZ
Comisión de Tesis



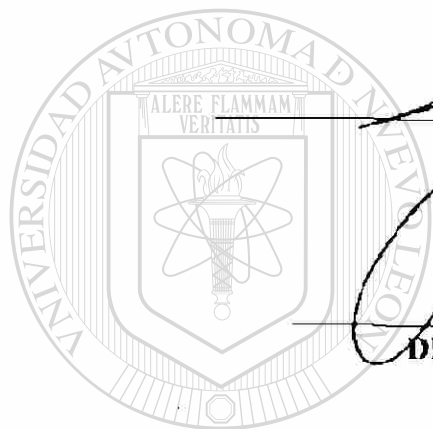
DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA
Comisión de Tesis



DR. JUAN MANUEL ALCOCER
Comisión de Tesis



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



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DEDICATORIA

A Dios

Por ser la fuerza interior que me hace seguir.

A mi familia

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

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

A mi familia de Monterrey

(Suegros, cuñados y sobrinos)

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

A mis amigos

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

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

A mi gran amor.

(Mauricio Reyes)

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

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

TABLA DE CONTENIDO

CONTENIDO

PAGINA

LISTA DE TABLAS

LISTA DE FIGURAS

NOMENCLATURA

RESUMEN

I.-INTRODUCCIÓN

1.1 El Cáncer Cervical

1

1.1.1 Historia natural y agente causal del CC.

2

1.2 Los virus del papiloma humano.

4

1.2.1 Morfología y características.

5

1.2.2 El genoma de los VPHs.

5

1.2.3 Clasificación de los VPHs.

7

1.2.4 Procesos Oncogénicos del HPV en CC y el papel de las oncoproteínas E6 y E7.

9

1.2.4.1 Regulación de los genes E6 y E7.

11

1.3 Variabilidad genómica de los VPHs como co-factor en la progresión a CC.

14

1.3.1 Variantes moleculares de los VPHs en la LCR.

16

1.4 Metilación del DNA como otro posible factor de oncogenicidad.

18

1.4.1 Represión transcripcional a través de la metilación del DNA.	19
1.4.2 Metilación del DNA y cáncer.	21
1.4.3 Metilación en los VPHs.	22

II.-JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN.	24
2.2 OBJETIVO.	24
2.2.1 Objetivo General.	24
2.2.2 Objetivos Específicos.	25

III.-ESTRATEGIA GENERAL

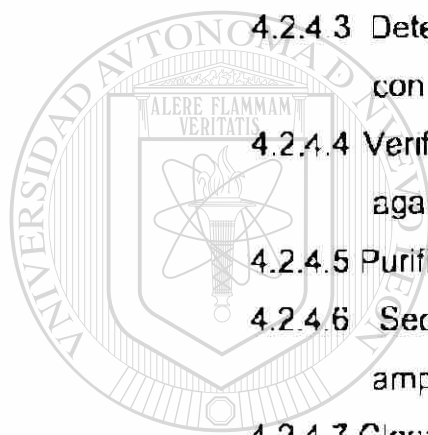
26

IV.-MATERIAL Y MÉTODOS

29

4.1 Área de trabajo, reactivos y equipo.	
4.1.1 Área de trabajo.	29
4.1.2 Material Biológico.	29
4.1.3 Material de plástico.	30
4.1.4 Reactivos.	30
4.1.5 Equipo.	32
4.1.6 Apoyo computacional.	33
4.2 Métodos.	35
4.2.1 Colección de muestras.	35
4.2.2 Procesamiento de la muestra.	35
4.2.3 Extracción de DNA genómico a partir de células cervicales.	36
4.2.3.1 Verificación de la calidad y la concentración del DNA.	37

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



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

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

VI.-DISCUSIÓN 89

VII.-CONCLUSIONES 102

VIII.-BIBLIOGRAFÍA 104

IX.-RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO 115

LISTA DE FIGURAS

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

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

LISTA DE TABLAS

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

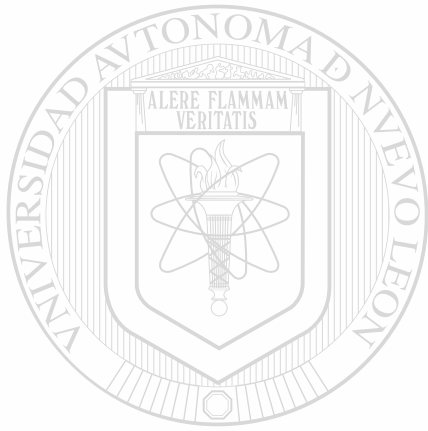


LISTA DE ABREVIATURAS

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

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

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

Número de páginas: 115


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

Área de estudio: Medicina Molecular

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

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

ASESOR INTERNO




Dr. Hugo A. Barrera Saldaña

ASESOR EXTERNO



Dr. Hans-Ulrich Bernard

CO-ASESOR



Dra. Rocio Ortiz López

CAPÍTULO I

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El Cáncer Cervical

El cáncer se define como un grupo de enfermedades caracterizadas por el crecimiento descontrolado de las células, con una invasión de tejido local y metástasis sistémicas.¹ Uno de los cánceres que ha alcanzado dimensiones de salud pública a nivel mundial² es el cáncer cervical (CC), el cual permanece siendo el segundo cáncer más común entre mujeres de todo el mundo. Aproximadamente 371,200 nuevos casos se diagnostican cada año, y casi 200,000 muertes son atribuibles a esta enfermedad. Sin embargo, la epidemiología del CC varía según el desarrollo y la cultura en las diferentes regiones del mundo.³ México tiene uno de los índices más altos del CC en el continente americano. La mortalidad actual debida al CC en todo México es de 10.8 por 100,000 personas, lo cual representa 4,585 muertes por año.^{3,4,5,6,7} En el estado de Nuevo León la situación también es alarmante, ya que el CC ocupa el segundo lugar como causa de muerte por cáncer (el primero lo ocupa el cáncer de mama).⁸ Se ha sugerido que los altos índices del CC en América Latina están ligados a las características, en gran parte desconocidas, de la variabilidad de su principal agente etiológico: el virus del papiloma humano o "VPH"; enfatizando la necesidad de conducir investigaciones sobre las variantes del virus.

El CC tiene su pico máximo de incidencia sobre la cuarta y quinta década de la vida, por lo que tiene un enorme impacto sobre la estructura familiar y sobre la sociedad, ya que estas mujeres mueren en una etapa productiva.⁹ Bajo los tratamientos actuales, la sobrevida a 5 años en pacientes con estadio III o IV no es superior al 35 %.¹⁰

1.1.1 Historia natural y agente causal del CC.

El CC es en realidad una enfermedad multifactorial debida tanto a factores ambientales como a factores propios del huésped. Los factores ambientales que se han relacionado con esta neoplasia son: posición socioeconómica baja, primer coito a edad temprana, prostitución, enfermedades de transmisión sexual, deficiencias nutricionales, tabaquismo, uso de anticonceptivos orales, etc.¹¹ Dentro de los factores propios del huésped, se ha propuesto una asociación entre ciertos haplotipos de HLA¹² y ciertos polimorfismos genéticos.¹³ Sin embargo ninguno de estos factores ha sido señalado como agente causal de esta enfermedad.¹¹

Hasta la fecha, el único factor que se ha involucrado directamente con el desarrollo de CC es la infección crónica por los diferentes tipos de VPHs, principalmente los denominados de alto riesgo (tipos 16, 18, 31 y 45),¹⁴ que están presentes en más del 90% de todos los casos de CC.¹⁵

En 1970 se describió por primera vez la posible asociación entre verrugas genitales (condilomas) e infección por este virus¹⁶ y desde 1977 zur Hausen y otros investigadores postularon al VPH como el agente etiológico del CC¹⁷. Entre las evidencias causales que indican que algunos VPHs están involucrados en CC, se sabe que:

- 1) El DNA viral se encuentra en más del 90% de dichos tumores (más frecuentemente el tipo 16);
- 2) En los tumores, el DNA de VPH se integra al genoma celular, rompiéndose e inactivándose el gen E2, lo que favorece la expresión de los oncogenes virales E6 y E7;
- 3) Los oncogenes de VPH de alto riesgo son capaces de inmortalizar cultivos primarios de queratinocitos humanos, pero necesitan la cooperación del oncogen ras para transformarlos.
- 4) Al cultivar durante tiempos largos las células inmortalizadas por E6 y E7, éstas dan origen a clones malignas, lo que sugiere que un gen celular se modifica en dichos cultivos, ¹⁸
- 5) Las oncoproteínas virales E6 y E7 destruyen la actividad de las proteínas antioncogénicas p53 y pRb, respectivamente, ^{19,20,21} las cuales están implicadas en alteraciones importantes del control del ciclo celular y su inactivación conduciría a la transformación maligna en CC.

Las lesiones premalignas y malignas del cérvix se originan en la zona de transformación, que consiste de un área de metaplasia inmadura entre el epitelio escamoso estratificado maduro del exocérvix y el epitelio columnar del endocérvix.²² Las infecciones con VPHs son resueltas por el huésped en >90; pero un pequeño porcentaje (1%) de mujeres con infección crónica no resuelta, evoluciona a CC invasivo.^{23,24,25,26,27} Se piensa que el intervalo de tiempo requerido entre la infección inicial por VPH y la presencia de cáncer *in situ* requiere un tiempo determinado, el cual varía desde un año hasta décadas, según estudios previos. Estos aspectos implican que la infección por VPH no es suficiente para el desarrollo del proceso maligno y que factores probablemente intrínsecos a las pacientes están implicados en CC.²⁸

1.2 Los virus del papiloma humano.

La estructura y composición de este virus fue demostrada primeramente mediante microscopía electrónica por Strauss en 1949.²⁹ Crawford & Crawford, en 1963,³⁰ describieron la primera caracterización del DNA de un VPH en su forma superenrollada, circular y lineal. Pero no fue hasta 1974 y 1976, que los investigadores comenzaron a postular y analizar un posible papel del VPH en CC.^{16,17,31} En 1976, Meisels y Fortín publicaron dos informes en donde describían el aspecto de coilocitos en barridos cervicales indicando la presencia de una infección con papilomavirus.^{32,33}

Los primeros tipos de VPH fueron aislados directamente de las biopsias con CC, siendo los VPH 16 y 18 clonados en 1983 y 1984,^{34,35} respectivamente. Esto inició una rápida expansión de este campo. La demostración de la heterogeneidad dentro de la familia del papilomavirus^{36,37,38} y el aislamiento subsecuente de tipos específicos de las verrugas genitales y de papilomas laríngeos,^{39,40} así como el uso de los procedimientos de hibridación de ácidos nucleicos bajo condiciones de reducida astringencia para buscar tipos relacionados (pero no idénticos al VPH 16⁴¹), permitió una mirada nueva al posible involucramiento de las infecciones del VPH en cánceres anogenitales.[®]

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En el plazo de cuatro años, los detalles experimentales básicos que explicaron el papel de los VPHs en la etiología del CC fueron descritos: la expresión de genes virales específicos (tales como E6 y E7) fueron demostrados en líneas celulares de CC y en biopsias de tumor;⁴² una ruptura específica dentro de la molécula viral en forma de anillo fue demostrada en copias genómicas integradas;⁴⁰ la característica de la inmortalización del DNA mediante la transfección de DNA viral^{43,44} y la codificación de oncogenes virales⁴⁵ apoyó las sospechas iniciales.

Los años subsecuentes dieron lugar a una mejor comprensión de las funciones virales oncogénicas y a un conocimiento más detallado de la historia natural de la infección del VPH. Un número abrumador de estudios epidemiológicos señalaron que los VPHs de alto riesgo eran un factor de riesgo primario para el CC. Amplios estudios epidemiológicos de casos y controles, así como estudios prospectivos, indicaron que las infecciones persistentes con VPH son el factor de riesgo más significativo para el CC.^{46,47,48}

1.2.1 Morfología y características.

Los VPHs son un grupo heterogéneo de virus que pueden ser detectados, además de en humanos, en una amplia variedad de animales; siendo específicos para sus respectivos hospederos. Los VPHs constituyen la familia Papilomaviridae. Estos virus son pequeños de 52 a 55 nm de diámetro, de forma icosaédrica y desnudos (no presentan envoltura de lípidos que cubra la cápside icosaédrica).⁴⁹

Los VPHs tienen una cápside compuesta de 72 capsómeros (60 hexaméricos y 12 pentaméricos)⁵⁰ que incluyen dos proteínas: una mayor codificada por el gen L1 y una menor codificada por el gen L2. Hasta la fecha, estos virus no han podido ser aislados a partir de especímenes clínicos mediante técnicas de cultivo celular, de modo que solo las técnicas de biología molecular han permitido grandes progresos en el campo de la caracterización de los VPHs. Además, la disponibilidad de sondas específicas ha hecho posible la detección de varias secuencias genómicas de VPHs en diferentes muestras clínicas.⁴⁰

1.2.2. El genoma de los VPHs.

Éste consiste de una molécula de doble cadena de DNA circular de aproximadamente 7200 a 8000 pb (8 Kb), asociado a histonas celulares que forman un compuesto parecido a la cromatina⁵¹ (ver figura 1). A todas las

secuencias codificantes dentro del genoma de estos virus se les denominan ORFs (del inglés: Open Reading Frame ó marcos de lectura abiertos). Estos ORFs codifican para diferentes proteínas a partir de un solo fragmento de DNA.

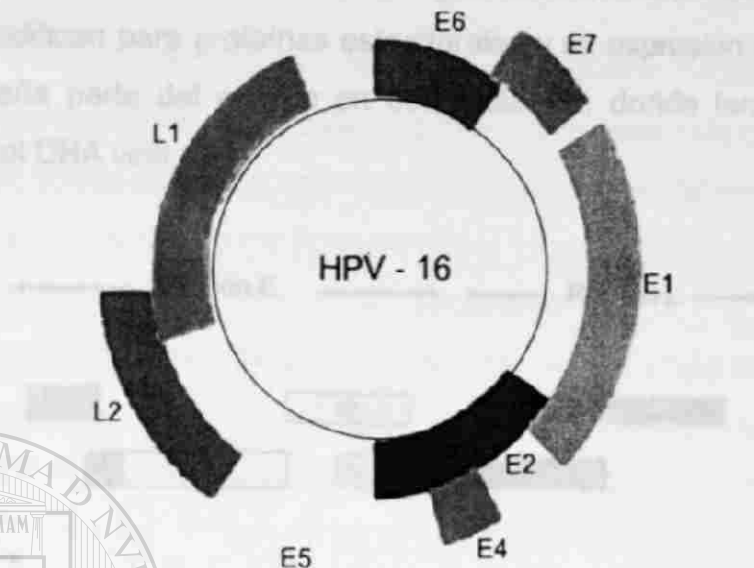


Figura 1 Organización circular del genoma del VPH 16. El genoma de los VPHs contiene entre 6800 y 8000 pb y está dividido en 8 ORFs: E6, E7, E1, E2, E4, E5, L2 y L1. Modificado de <http://www.bioscience.org/2002/v7/d/munger/figures.htm>.

El genoma está funcionalmente dividido en tres regiones (ver figura 2):

1) La primera región abarca entre 400 a 1000 pb. Esta región no codifica para proteína alguna y se le ha denominado "Región No Codificante" ó NCR (del inglés: Non-Coding Region), ó "Región Larga de Control" ó LCR (del inglés: Long Control Region), ó también "Región Reguladora de Arriba" ó URR (del inglés: Upstream Regulatory Region). Esta región contiene al promotor central p97, así como a secuencias silenciadoras y potenciadoras que regulan la transcripción y la replicación de genes, tanto virales como celulares.

2) La Segunda región corresponde a la región "temprana ó secuencias E" (del inglés: Early) consistiendo de los ORFs E1, E2, E4, E5, E6 y E7, los cuales están involucrados en la replicación y transformación celular, siendo su expresión detectable en áreas proliferativas de lesiones inducidas por estos virus. El gen E3 sólo se encuentra en el virus del papiloma bovino (VPB).

3) La tercera región esta formada por las secuencias "tardías ó secuencias L" (del inglés Late) para indicar el momento de la expresión durante el ciclo de vida del virus. Dentro de esta región se encuentran los genes L1 y L2, los cuales codifican para proteínas estructurales y su expresión está restringida a una pequeña parte del epitelio en diferenciación, donde también ocurre la replicación del DNA viral.

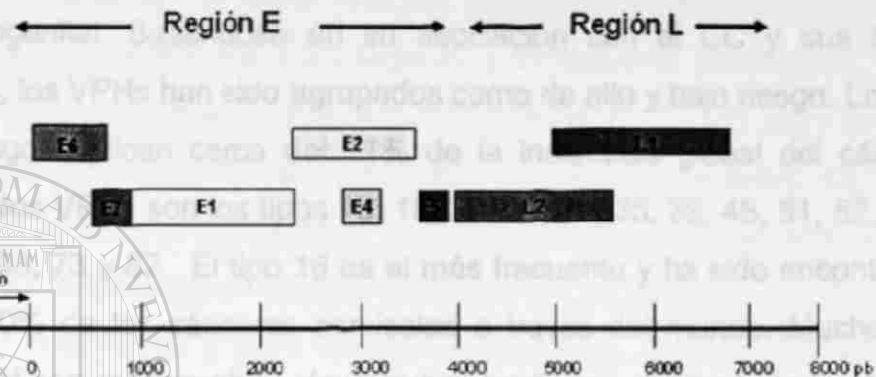


Figura 2. Organización genómica lineal del VPH 16. En la parte superior se ilustran las dos regiones: temprana "E" y tardía "L". Posteriormente se esquematizan algunos de los ORFs para los genes que conforman el genoma de este virus. La escala inferior señala a que nivel del gen se encuentran codificadas dichas proteínas. Pm representa el lugar donde se encuentra el promotor temprano. Modificada de www-ermm.cbcu.cam.ac.uk/smc/fig002smc.htm.

1.2.3 Clasificación de los VPHs.

Con base en su secuencia genómica, han sido reconocidos más de 200 tipos de VPHs. Ochenta y cinco genotipos virales han sido bien caracterizados y 120 aislados virales han sido parcialmente caracterizados como potencialmente nuevos genotipos.⁵² La clasificación del tipo viral está basada en alineamientos de secuencias nucleotídicas. Por definición, se considera a un **nuevo tipo** de VPH cuando éste tiene **menos del 90% de similitud** en su secuencia cuando son analizados sus genes E6, E7 y L1 frente a los de tipos de VPHs ya conocidos.⁵³ Los VPHs han sido clasificados en **subtipos** cuando tienen de un **90 a un 98% de similitud** en sus secuencias y se consideran las **variantes** cuando muestran **98% o más de similitud** en sus secuencias.⁵⁴ Para los virus

caracterizados se ha determinado su tropismo en diferentes especies y varios estudios han sugerido una estrecha asociación entre tipos particulares de VPHs y neoplasias benignas y malignas determinadas.

Los VPHs pueden infectar las células epiteliales basales de la piel o capas internas de tejidos y son categorizados como tipos cutáneos o mucosos. Los tipos de VPHs cutáneos son epidermitróficos y su blanco es la piel de manos y pies, mientras que los tipos mucosos infectan el tracto respiratorio y el epitelio anogenital. Basándose en su asociación con el CC y sus lesiones precursoras, los VPHs han sido agrupados como de alto y bajo riesgo. Los VPHs de alto riesgo explican cerca del 11% de la incidencia global del cáncer en mujeres. Estos VPHs son los tipos 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82. El tipo 16 es el más frecuente y ha sido encontrado en cerca del 50% de los cánceres cervicales a través del mundo. Muchos otros tipos de VPH son responsables de verrugas benignas, destacando los VPH 6 y 11, aunque los VPHs se encuentran implicados en muchas otras enfermedades (ver tabla 1).

Tabla 1. Tipos de VPHs encontrados y su asociación con enfermedad.

Enfermedad	Tipo de VPH
Carcinoma cervical	16,18,31,45,33,35,39,51,52,56,58,66,70.
Verrugas plantales	1, 2, 4, 63
Verrugas comunes	2,1,7,4,26,27,29,41,57,65,77,3,4,10,28
Otras lesiones cutáneas *	6, 1, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
Epidermoplastia verruciforme	2,3,10,5,8,9,12,14,15,17,19,20,21,22,23,24 25,36,37,38,47,50.
Recurrente papilomatosis respiratoria	6,11.
Hiperplasia epitelial focal de Heck	13, 32.
Papilomas/ carcinomas conjuntivos	6, 11, 16.
Verrugas genitales **	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70.
Neoplasia cervical intraepitelial No especificado	30,34,39,40,53,57,59,61,62,64,66,67,68,69.
Bajo riesgo	6,11,40,42,43,44,54,61,70,72,81,cp6108.
Alto riesgo	16,18,26,31,33,35,39,45,51,52,53,56,58,59,66,68,73,82.

* Ejemplo: carcinoma laríngeo

** Condiloma acuminata

A la fecha se ha podido demostrar que la presencia de los VPHs oncogénicos o de alto riesgo, está asociado con más del 98% de todos los casos de CC,⁵⁵ evento que parece ser una condición necesaria pero no suficiente para causar este cáncer.

La prevalencia de los tipos de VPHs encontrados en CC, así como de sus lesiones precursoras, ha mostrado variaciones geográficas a través del mundo.⁴⁷ En África occidental, el VPH 45 es más frecuente, mientras que en Centroamérica y Sudamérica a los tipos 39 y 59 son más prevalentes, y en las islas del Pacífico, los tipos 52 y 58 son más frecuentes.^{56,57} Se sabe que el tipo 16 es el más predominante, encontrándose en el 50% de todos los tumores analizados.⁴⁵ El entendimiento de la distribución de los tipos de alto riesgo del VPH en una área específica tiene importantes implicaciones para futuros estudios de diagnóstico y para diseños de vacunas, tanto profilácticas como terapéuticas, para el CC.

1.2.4 Procesos oncogénicos del VPH en CC y el papel de las oncoproteínas E6 y E7.

El estudio de la infección de VPHs ha mostrado que ésta se inicia en las células basales de epitelios estratificados, donde ocurre una combinación particular de factores celulares que interactúan con la región LCR que inicia la transcripción de los oncogenes virales E6 y E7.

Los VPHs contribuyen a la progresión neoplásica predominantemente a través de la acción de las oncoproteínas, pE6 y pE7.^{19,58} Estas proteínas son consistentemente expresadas en líneas celulares cancerosas y contribuyen a la inmortalización de los queratinocitos *in vitro*.⁵⁹ Tanto pE6 como pE7 forman complejos con importantes reguladores del ciclo celular, en particular con las proteínas p53 y p105-Rb, respectivamente, llevando a la alteración de los

procesos de reparación del DNA, así como a los del control del ciclo celular y apoptosis^{60,61} (ver figura 3).

Las oncoproteínas pE6 y pE7 perturban la regulación del ciclo celular promoviendo la replicación del DNA en células diferenciadas al dirigir las de la fase G1 a la fase S. Esta acción es causada principalmente por pE7 y le permite al virus replicarse. pE7 interactúa con p105-Rb e impide que este supresor de tumor se asocie con el factor de transcripción celular E2F.^{62,63} Normalmente en una célula diferenciada, la unión entre E2F y pRb funciona como un represor activo de genes involucrados en la progresión del ciclo celular, ocasionando una pobre expresión de los reguladores dependientes de E2F, tales como ciclina A, ciclina E y Cdk2.⁶³ Sin embargo, al expresarse la oncoproteína E7, compete directamente con E2F para unirse a pRb, resultando en un incremento de E2F libre, con la consecuente activación de genes de progresión celular.⁶⁴ E7 puede además alterar la regulación de diversos genes mediante su unión a la proteína de unión a la caja TATA (TBP, en inglés), implicada en el posicionamiento de la maquinaria transcripcional sobre los promotores génicos.⁶⁵

Por otro lado, la interacción entre pE6 con p53, bloquea su función y la marca para su degradación, impidiendo la apoptosis normal y favoreciendo la acumulación de daño.^{66,67} De esta forma, la célula es inducida a permanecer en un estado de división celular constante, con lo cual hay disponibilidad de toda la maquinaria de replicación del DNA a fin de que el virus pueda utilizarla. Se sabe también que p53 puede bloquear al promotor temprano de estos virus, ya que interactúa con la TBP, así que la eliminación de p53 garantiza el funcionamiento del promotor temprano.⁶⁸ Adicionalmente, se ha reportado que E6 es capaz de incrementar la actividad de las telomerasas, previniendo el acortamiento de los telómeros durante la replicación celular.⁶⁹

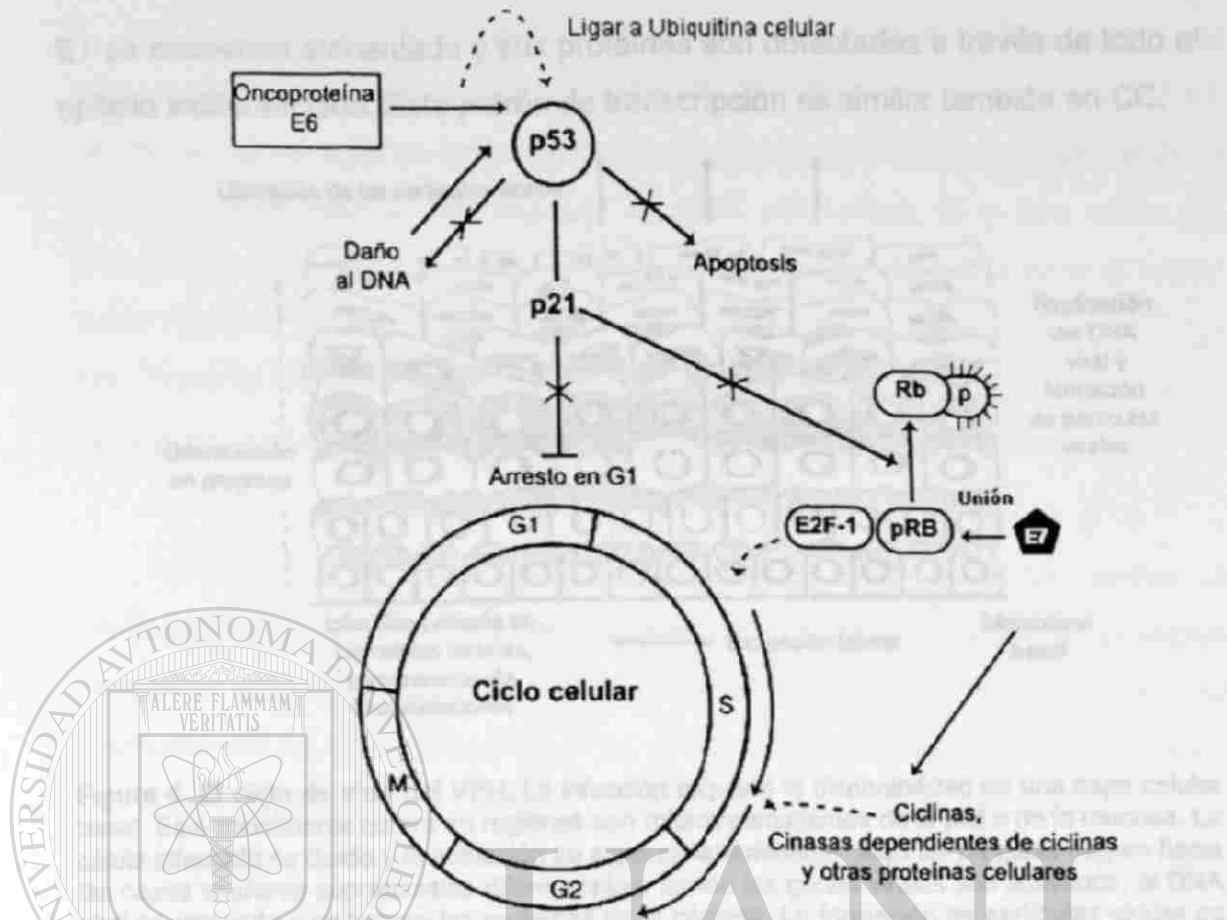


Figura 3. Funciones de las oncoproteínas virales y su interacción con proteínas celulares. Los genes E6 y E7 del VPH codifican para proteínas multifuncionales que se unen principalmente a p53 y pRB, respectivamente, alterando sus funciones, y llevando a la transformación celular mediante la alteración de las vías reguladoras del ciclo celular. Modificado de <http://cmr.asm.org/cgi/content/full/16/1/1/F2>.

1.2.4.1 Regulación de los genes E6 y E7.

Los patrones de transcripción viral cambian considerablemente en las diferentes capas del epitelio infectado (ver figura 4) y en los diferentes grados de lesiones epiteliales, ya sean benignas, premalignas o cancerosas. En una infección productiva, la expresión se lleva a cabo en la capa espinosa o superior. En lesiones de bajo grado, como los condilomas, tanto la proteína pE6, como la proteína pE7 (en mayor grado), son expresadas intensa y únicamente en las dos o tres capas más profundas (menos diferenciadas) del epitelio.⁷⁰ En lesiones de alto grado (NIC III), la transcripción de los genes E6 y

E7 se encuentra aumentada y sus proteínas son detectadas a través de todo el epitelio indiferenciado. Este patrón de transcripción es similar también en CC.

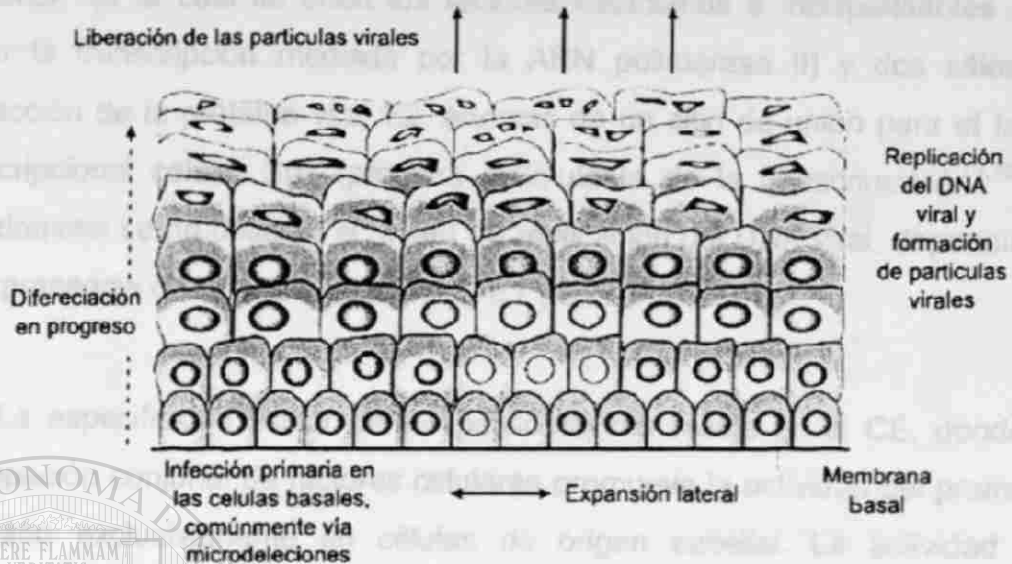


Figure 4. El ciclo de vida del VPH. La infección requiere la disponibilidad de una capa celular basal. Esto usualmente ocurre en regiones con microtraumatismos de la piel o de la mucosa. La célula infectada se divide y la población se esparce lateralmente. Algunas de estas migran hacia las capas celulares suprabasales diferenciadas, donde los genes virales son activados, el DNA viral es replicado y se forman las proteínas de la cápside. La formación de partículas virales es aumentada para finalmente ser liberadas a la superficie donde podrán infectar otros tejidos. Tomado de www.nature.com/cgi-taf/DynaPage.taf?file=/nrc/journal/v2/n5/full/nrc798_fs.html.

Elementos de respuesta ubicados contiguos a los genes que regulan la transcripción de los oncogenes E6 y E7, están dispersos por toda la LCR⁷¹ un segmento que varía entre los 800 y 1000 pb (dependiendo del tipo de VPH) y que está ubicado entre los genes L1 y E6. No obstante lo anterior, la LCR conserva elementos de regulación comunes a todos ellos. Funcionalmente se encuentra dividida en dos dominios principales (ver figura 5): el RE2 (dominio de respuesta a E2), regulado por la presencia de la proteína viral E2 y donde se localizan tanto el origen de replicación del DNA viral, como el promotor temprano; y el dominio CE (celular enhancer), un fuerte potenciador de la transcripción cuya activación depende de factores transcripcionales celulares, exclusivamente.⁷²

En el dominio RE2 se encuentra el promotor temprano (p97), a partir del cual se transcriben los oncogenes E6 y E7.^{42,73} Este posee una caja TATA funcional (a la cual se unen los factores necesarios e indispensables para iniciar la transcripción mediada por la ARN polimerasa II) y dos sitios de interacción de la proteína viral E2, además de un sitio de unión para el factor transcripcional celular Sp1 (proteína estimulante de la transcripción).^{74,75} En este dominio se ha descrito el origen de replicación del DNA viral, dependiente de la presencia de las proteínas virales E1 y E2.⁷⁶

La especificidad tisular de los papilomavirus reside en el CE, donde la participación conjunta de factores celulares promueve la actividad del promotor temprano exclusivamente en células de origen epitelial. La actividad del promotor p97 es débil, sin embargo es estimulada por un potenciador con sitios de unión para muchos factores incluyendo AP1, NF1, el receptor a la progesterona y un elemento de respuesta a glucocorticoides (ERG), el cual promueve la transcripción de los VPHs por un estímulo hormonal.^{77,78,79,80} Dos nucleosomas específicamente posicionados pueden formarse sobre la LCR a nivel del potenciador y el promotor⁸¹ y reprimir la transcripción cuando son modificados por histonas-desacetilasas (HDACs). Las HDACs están asociadas con CDP y YY1, dos factores transcripcionales que se unen a un silenciador posicionado entre el potenciador y el promotor.⁸² CDP también se une a dos regiones en la matriz nuclear flanqueantes (MARs) con localización en el extremo 5' (o río arriba) de LCR y en el gen E6. Cuando los genomas de VPH se integran al DNA celular durante la progresión a malignidad, estos MARs, localizados al extremo 3' o río abajo del promotor p97, se convierten en fuertes estimuladores transcripcionales capaces de influir sobre muchos otros mecanismos.⁸¹

La transcripción de los oncogenes E6 y E7 también es regulada por la proteína viral E2, la cual puede actuar como un represor de la transcripción viral génica temprana, al mismo tiempo que se encuentra involucrada en el control

de la replicación del DNA viral. La alteración de la función de E2, ya sea por su eliminación durante la inserción en el genoma del huésped (mecanismo propio del virus) o por posibles mutaciones puntuales, resulta en el incremento de la expresión de los genes E6 y E7.^{83,84,85,86}

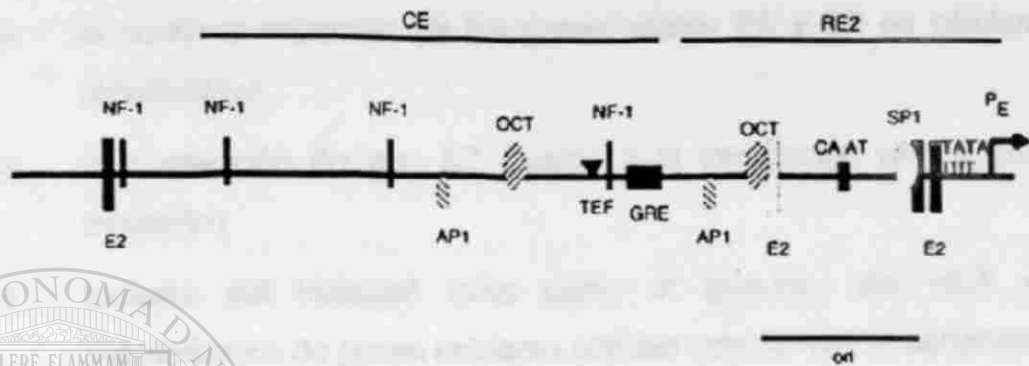


Figura 5. Mapa de la región larga de control de los VPHs. RE2: dominio de respuesta a E2; CE: potenciador epitelio-específico; Ori: Origen de replicación; NF-1: sitio de unión para el factor nuclear 1; AP 1: sitio de unión para la proteína activadora 1; OCT: sitio de unión para el factor asociado al octámero 1; E2: sitio de unión para la proteína viral E2; Sp 1: sitio de unión para la proteína estimulante 1; P_E: promotor temprano; TATA: caja TATA; GRE: sitio de unión para el receptor a glucocorticoides; TEF: sitio de unión para el factor de transcripción del potenciador.

1.3 Variabilidad genómica de los VPHs como co-factor en la progresión a

CC.

La historia natural de la infección por VPH aún no está claramente entendida. La persistencia de la infección por VPHs de alto riesgo es considerada como el principal factor de riesgo para la transformación maligna. La transformación, sin embargo es un proceso de muchos pasos que requiere de otros factores además de la infección. La mayoría de las infecciones se resuelven espontáneamente en un cierto plazo.⁸⁷ Solamente una pequeña proporción de NICs 1 y 2 evolucionará a CC, pero el riesgo de progresión de NICs 3 a cáncer invasor es de al menos el 12%, como ha sido demostrado por estudios de meta-análisis con seguimiento en un rango de 0.5 a 20 años.^{88,89}

Varios estudios epidemiológicos han identificado factores de riesgo adicionales involucrados en la progresión de NIC 1 a NIC 3 y CC.^{90,91,92}

- i) Factores virales tales como la persistencia de la infección con VPH,
- ii) la integración del DNA viral en el cromosoma celular del huésped,
- iii) la continua expresión de los genes virales E6 y E7 en células replicándose,
- iv) la inactivación del gen E2 (debido a la integración viral o por mutación)
- v) factores del huésped tales como el genotipo del HLA y polimorfismos de genes celulares podrían también ser importantes para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo transformado.^{59,93,83,85,94,95,96}

Recientemente se ha sugerido que la variabilidad intratípica de los VPHs esté también implicada en la transformación maligna.^{97,98} Algunas variantes tienen propiedades biológicas y bioquímicas diferentes.⁹⁹ Consecuentemente, se ha asumido que éstas podrían también diferir en patogenicidad. La observación de que ciertas variantes son más prevalentes en ciertas regiones geográficas no es sorprendente y podría ser explicada por el efecto "fundador",[®] la co-evolución de los VPHs con las razas humanas, o por los patrones de migración humana. Esto también podría reflejar un origen potencial para ciertos tipos de VPHs en ciertas regiones geográficas.

El análisis de la variabilidad genómica de los diferentes tipos de VPHs tiene muchos objetivos. Es importante tener una base de datos para:

- 1) El desarrollo de herramientas de diagnóstico y vacunas eficientes.
- 2) Aplicación en los estudios epidemiológicos, en los cuales la variación en la secuencia puede ser usada como marcador para monitorear los VPHs en poblaciones definidas.

- 3) Estudios de relación entre genotipo y fenotipo (por ejemplo ciertas variantes pueden estar positiva o negativamente asociadas con la enfermedad cervical, dependiendo de sus diferentes propiedades biológicas y funcionales).
- 4) Estudios taxonómicos y evolutivos.

1.3.1 Variantes moleculares de los VPHs en la LCR.

La LCR despliega un alto grado de diversidad, similar a aquellas regiones que flanquean los genes en otros organismos. La diversidad en las secuencias de las muestras analizadas ha alcanzado hasta un 5% en esta región, mientras que para la mayoría de los genes, las regiones homólogas exhiben menos de un 2%. Analizando la LCR de una amplia colección de muestras cervicales positivas para VPH 16, Ho y cols.¹⁰⁰ encontraron que la variación en la secuencia del VPH 16 formaba cuatro diferentes ramas filogenéticas:

- i) Las variantes asiático-americanas (AA), las cuales son encontradas principalmente en Centro y Sudamérica, así como en España.
- ii) Las variantes africanas (Af-1 y Af-2), encontradas en África. ®
- iii) Las variantes Asiáticas (As) encontradas en el sureste de Asia.
- iv) Las variantes Europeas (E), encontradas en todas las regiones, excepto África.

Subsecuentes estudios completaron la clasificación de estas variantes a través del análisis de la secuencia de los genes E6, L1, L2 y la LCR del VPH 16, agregando a la variante Norteamericana-1.^{101,102}

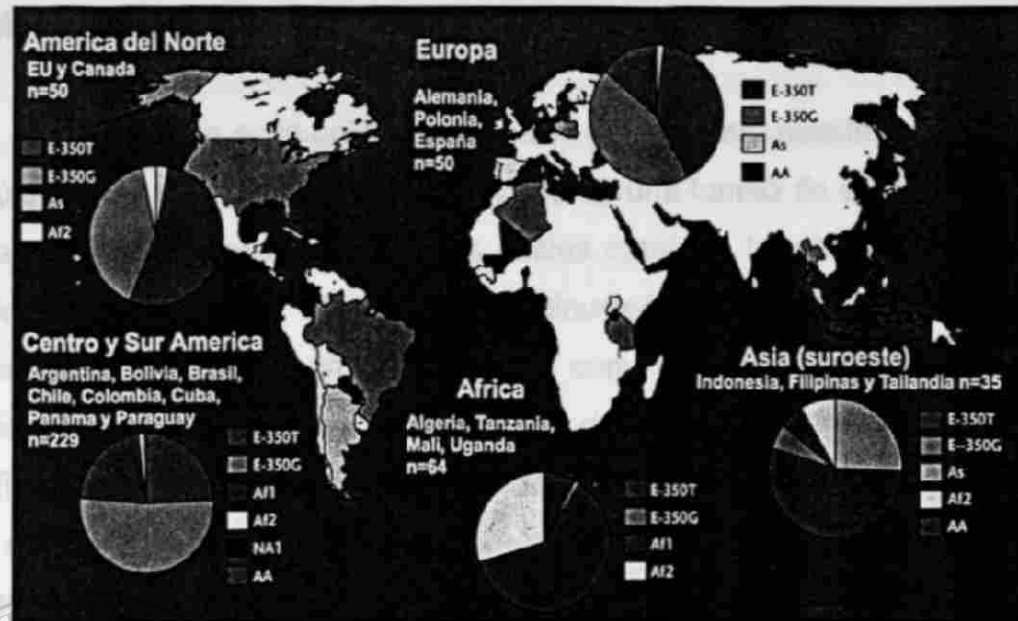


Figura 6. Distribución geográfica de las variantes del VPH 16 en el mundo. Se muestran los diferentes tipos de variantes encontradas alrededor del mundo. Modificado de www.pubmedcentral.nih.gov/picrender.fcgi?artid=191357&action=stream&blobtype=pdf.

Diversos estudios han indicado que la persistencia viral y el desarrollo de lesiones de alto grado y del CC, están no solo directamente asociadas con la presencia del VPH 16, sino también con las variantes específicas de éste.

La LCR contiene sitios de unión para la proteína viral reguladora de la transcripción E2,¹⁰³ así como para factores de transcripción celular, los cuales modulan su función positivamente (Ap1, Sp1, Nf1, Oct-1, Tef-1) o negativamente (YY1). Los cambios nucleotídicos dentro de esta región reguladora pueden influir en la replicación y en la transcripción, a través de un efecto en la unión de complejos de proteínas reguladoras con el DNA. Los cambios dentro de los sitios de unión a YY1, juegan un papel especial, ya que tienen el potencial de aumentar la expresión de las oncoproteínas virales.

1.4 Metilación del DNA como otro posible factor de oncogenicidad.

La metilación es la única modificación del DNA en mamíferos que ocurre comúnmente y es generada por la actividad de una familia de enzimas de DNA llamada *metiltransferasas (DNMT)*, las cuales catalizan la adición de un grupo metilo a los residuos de citosinas en los dinucleótidos CpG.¹⁰⁴ Alteraciones en la metilación del DNA son consideradas como cambios epigenéticos, y no genéticos, ya que afectan la estructura del DNA, más no la capacidad codificadora de los genes. El genoma humano exhibe una clara disminución de los dinucleótidos CpG, presumiblemente debido al alto porcentaje de desaminación de la 5-metilcitosina, lo que genera timina y por ende resulta en una transición. Sin embargo, el genoma también contiene pequeños fragmentos de hasta unas pocas de kilobases de longitud, que son relativamente ricas en dinucleótidos CpG, y estos fragmentos son conocidos como islas CpG. A diferencia del resto del DNA, donde los dinucleótidos CpG son altamente metilados, los dinucleótidos CpG en estas islas se encuentran usualmente libres de metilación en tejido adulto, y este patrón de metilación del DNA es heredado establemente de una generación celular a la siguiente. En el genoma existen ~30,000 islas de CpG, con el 50 al 60% de las cuales estando asociadas con genes, usualmente dentro de la región promotora.¹⁰⁵ La importancia de las islas CpG fue revelada por estudios que demostraron que la metilación de las islas CpG dentro de los promotores de los genes están asociadas con la represión transcripcional.

Los requisitos para la metilación del DNA en tejido adulto podrían ser mucho menores¹⁰⁶ y su papel primario podría ser mantener la mayoría de la porción no-codificante del genoma en un estado inactivo transcripcionalmente, incrementando así la especificidad de los factores de transcripción por sus sitios blanco dentro de los genes.¹⁰⁷ La metilación del DNA en las islas CpG como un mecanismo para el control de la expresión génica específica en tejidos adultos, parece estar principalmente restringida a dos pequeñas clases de genes.

Primero, la inactivación del cromosoma X en mujeres está asociada con la metilación generalizada de las islas CpG en el cromosoma X inactivado.¹⁰⁸ Segundo, en la "impronta genética", donde sólo uno de los alelos heredados es expresado (ya sea el del padre o el de la madre), la inactivación del alelo no expresado se ha asociado con metilación en su promotor.¹⁰⁹

1.4.1 Represión transcripcional a través de la metilación del DNA.

El papel para la metilación del DNA en la regulación diferencial de la expresión génica fue hipotetizada muchos años atrás.^{110,111} El mecanismo potencial fue sugerido por un número de observaciones tempranas en las cuales la metilación en las citosinas sitio específicas que estaban dentro o adyacentes a genes, correlacionaban con represión transcripcional.^{112,113,114,115,116} Subsecuentemente, esta relación inversa entre citosinas metiladas y transcripción ha sido observada en un gran número de genes, aunque esto no es una regla universal.

Tres posibles mecanismos han sido propuestos para explicar la supresión de la transcripción por la metilación del DNA (ver figura 7).

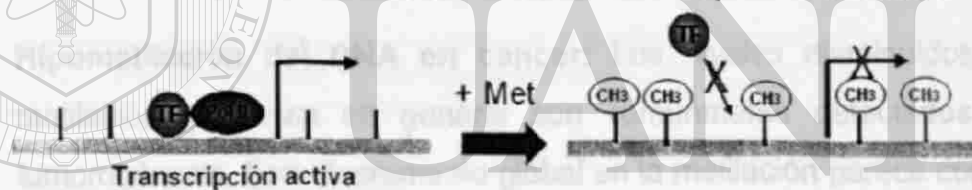
1) El primer mecanismo involucra la **interferencia directa con la unión de los factores de transcripción a sus sitios de reconocimiento** en sus respectivos promotores. De hecho, un número importante de factores de transcripción ha mostrado ser sensible a la metilación para su unión dentro de sus sitios de reconocimiento.¹¹⁷ Sin embargo, algunos factores de transcripción son insensibles a la metilación (por ejemplo Sp1) y otros no tienen sitios CpG dentro de sus secuencias de reconocimiento.

2) En años recientes, un segundo mecanismo más aplicable por el cual la metilación del DNA podría mantener la represión transcripcional, ha empezado a ser elucidado. Este mecanismo involucra a una familia de

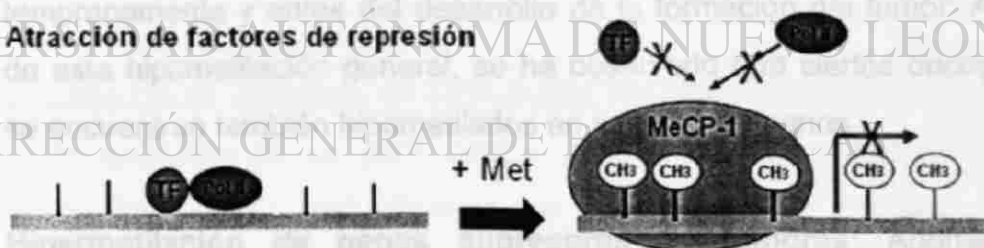
proteínas recientemente descubierta conocidas como **proteínas con dominio de unión a grupo metilo (MBD)**.¹¹⁸ Los miembros de esta familia de proteínas muestran un MBD común, el cual les permite unirse específicamente a DNA que contiene sitios CpG metilados. Al menos 3 de los 5 miembros de esta familia (MeCP2, MBD2 y MBD3) han mostrado estar asociados con un gran complejo de proteínas^{119,120} que tienen actividad de histona-desacetilasas (HDAC1 y HDAC2) y de remodelación de la cromatina (Sin 3a y mi-2). Se cree que la acción de las actividades de las histona-desacetilasas y de remodelación de la cromatina resulta en la producción de una cromatina compacta que es refractaria a la transcripción.¹²¹

3) Finalmente, un tercer mecanismo sugiere que la metilación puede mediar la represión transcripcional alterando la estructura de la cromatina.

1) Interferencia con la unión de los factores de transcripción a sus sitios



2) Atracción de factores de represión



3) Alteración de la estructura de la cromatina

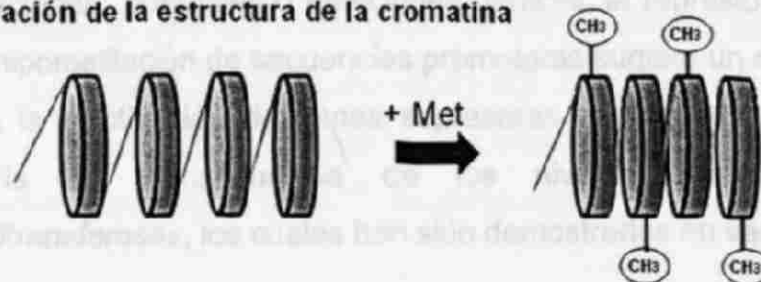


Figura 7. Mecanismos propuestos para explicar la supresión de la transcripción por la metilación del DNA. La metilación o impide la unión de factores transcripcionales, o atrae a proteínas que desplazan a esto, o simplemente compacta más a la cromatina.

1.4.2 Metilación del DNA y cáncer.

Se ha observado que durante la carcinogénesis se manifiestan fenómenos de hipometilación global e hipermetilación regional. Así también, se han reportado en células transformadas que algunas veces éstas incrementan la actividad de sus *metiltransferasas*. La contribución potencial de la metilación del DNA a la oncogénesis parece ser mediada por uno o más de los siguientes mecanismos:

- a) **Mutaciones puntuales C→T en células cancerosas:** el alto porcentaje de mutaciones en las citosinas pertenecientes a los nucleótidos CpG, sitio blanco de las *metiltransferasas*, puede incrementar el porcentaje de transición de citosinas a timinas, como consecuencia de la desaminación hidrolítica¹²² (ver figura 8).
- b) **Hipometilación del DNA en cáncer:** Los niveles disminuidos de la metilación genómica en general son comúnmente detectados en la tumorigénesis. Este decremento global en la metilación parece comenzar tempranamente y antes del desarrollo de la formación del tumor. Aparte de esta hipometilación general, se ha observado que ciertos oncogenes se encuentran también hipometilados en tumores humanos.
- c) **Hipermetilación de genes supresores de tumores:** Además de mutaciones puntuales o deleciones génicas, la represión transcripcional por hipometilación de secuencias promotoras sugiere un medio alternativo para la inactivación de genes supresores de tumores en cáncer. Esto podría ser consecuencia de los niveles aumentados de las *metiltransferasas*, los cuales han sido demostrados en varios cánceres.¹²³

A) Mutaciones puntuales C→T



B) Hipometilación de oncogenes



C) Hipermetilación en genes supresores de tumores



Figura 8. Modelos de los diferentes mecanismos a través de los cuales la metilación del DNA lleva a la oncogénesis. Las figuras esquematizan los posibles mecanismos mediante los cuales la metilación podría llevar a la oncogénesis.

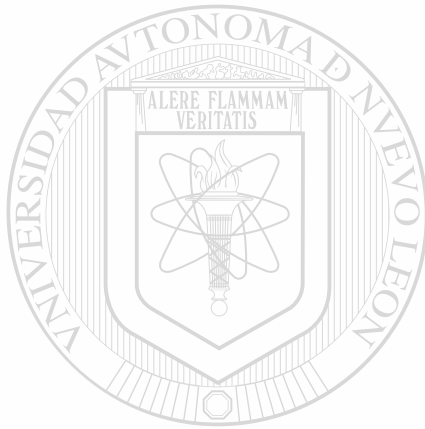
1.4.3 Metilación en los VPHs.

La metilación de genomas de VPH *in situ* ha sido pobremente estudiada, pero existe evidencia de su participación potencial en la regulación de la transcripción del genoma viral. Primero, las islas CpGs son escasas en los VPHs, de manera similar a su hospedero humano. Segundo, cuando DNA de VPH 16 metilado *in vitro* fue introducido por transfección a células en cultivo, éste falló en expresarse,¹²⁴ tal y como ocurre con el DNA de VPH 16 resistente a *Eco* RI (por estar metilado) estudiado en una línea celular específica.¹²⁵ Tercero, recientes estudios por Badal y cols¹²⁶ revelaron que:

- i) El DNA del VPH 16 es un blanco eficiente para la metilación.
- ii) Las regiones metiladas preferencialmente están asimétricamente distribuidas por el genoma.

- iii) La metilación ocurre en las islas CpGs que se traslapan con el promotor y el potenciador.
- iv) La frecuencia de la metilación de las CpGs decae durante las etapas progresivas del cáncer.

Los anteriores hallazgos sugieren que la metilación de los dinucleótidos CpG está involucrada con la etiología del cáncer y podría ser utilizada como marcador de diagnóstico.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO II

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

2.1 JUSTIFICACIÓN

Aunque existen avances significativos en el entendimiento de la relación entre los VPHs y el CC, éste sigue cobrando la vida de muchas mujeres, sobre todo en países en vías de desarrollo, como lo es México. Las nuevas herramientas aportadas por la biología molecular y las ciencias genómicas, prometen mejorar nuestro entendimiento de los procesos de carcinogénesis que dispara este virus en el tejido cervical, por lo que esperamos que el estudio de la variabilidad genética y de fenómenos epigenéticos poco estudiados como la metilación, ayuden a entender mejor los mecanismos tumorigénicos de los VPHs.

2.2 OBJETIVOS

2.2.1 Objetivo General:

Mejorar el entendimiento etiológico y epidemiológico del VPH en la población del área metropolitana de Monterrey, su variación genómica y sus cambios epigenéticos, como variables potencialmente sinérgicas y co-determinantes de su potencial tumorigénico.

2.2.2 Objetivos específicos:

1. Preparar un banco de DNA a partir de muestras cervicales de mujeres del área metropolitana de Monterrey.
 2. Determinar en éste la prevalencia y los tipos de VPHs con base en sus variaciones nucleotídicas en los genes L1, L6 y E7.
 3. Analizar las variantes moleculares de la LCR de los tipos más prevalentes de VPH, mediante PCR y secuenciación nucleotídica, con la finalidad de conocer sus diferencias genómicas.
 4. Determinar el estado de metilación en muestras VPH 16 positivas de mujeres asintomáticas (normales) y con cáncer cervical, mediante modificación con bisulfito de sodio, PCR y secuenciación nucleotídica.
-
- UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
5. Detectar los transcritos E6/E7 en las muestras VPH positivas metiladas y no metiladas.
 6. Interpretar los hallazgos de prevalencia, variabilidad genómica y metilación del DNA.

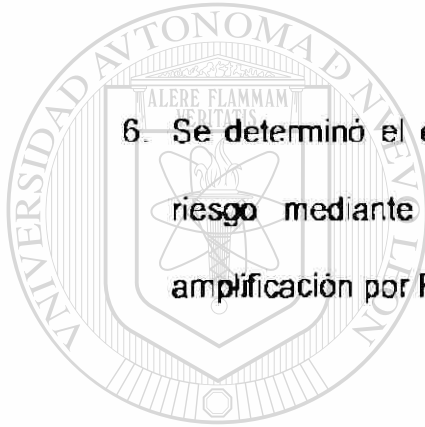
CAPÍTULO III

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir los objetivos planteados, se siguió la estrategia detallada e ilustrada a continuación (Figura 9).

1. Se recolectaron un total de 1282 muestras de células cervicales a partir de mujeres del área metropolitana de Monterrey, siendo cada muestra dividida en dos fracciones: una fue utilizada para extraer DNA genómico con la técnica *proteínasa K/fenol-cloroformo* y constituir un banco de DNA. Con la segunda fracción se obtuvo RNA total.
2. La integridad y calidad del DNA fue monitoreada mediante la amplificación del gen del hospedero β -actina.
3. El DNA genómico fue usado para amplificar el DNA del VPH mediante el empleo de los oligonucleótidos consenso MY11/MY09, LCR- E7/pU1M-pU2R, así como oligonucleótidos tipo específico para VPHs de alto riesgo, mediante PCR y secuenciación.

4. Con la finalidad de conocer su variación intratípica, se llevó a cabo el análisis de las variantes moleculares de los tipos de VPH de alto riesgo, mediante la amplificación de su LCR por PCR y secuenciación nucleotídica.
5. Los cambios nucleotídicos en la LCR de los VPHs de alto riesgo fueron comparados con las secuencias de referencia y las variantes fueron establecidas.
6. Se determinó el estado de metilación de la LCR de los VPHs de alto riesgo mediante modificación con bisulfito de sodio, seguida por amplificación por PCR.
7. Los productos amplificados provenientes de la modificación fueron clonados y secuenciados. Las secuencias fueron analizadas y el grado de metilación fue determinado.
8. Se analizaron los niveles de los transcritos de VPH de muestras metiladas y no metiladas mediante la técnica NASBA.
9. Se analizaron todos los resultados y se realizó una correlación entre los hallazgos genéticos y epigenéticos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

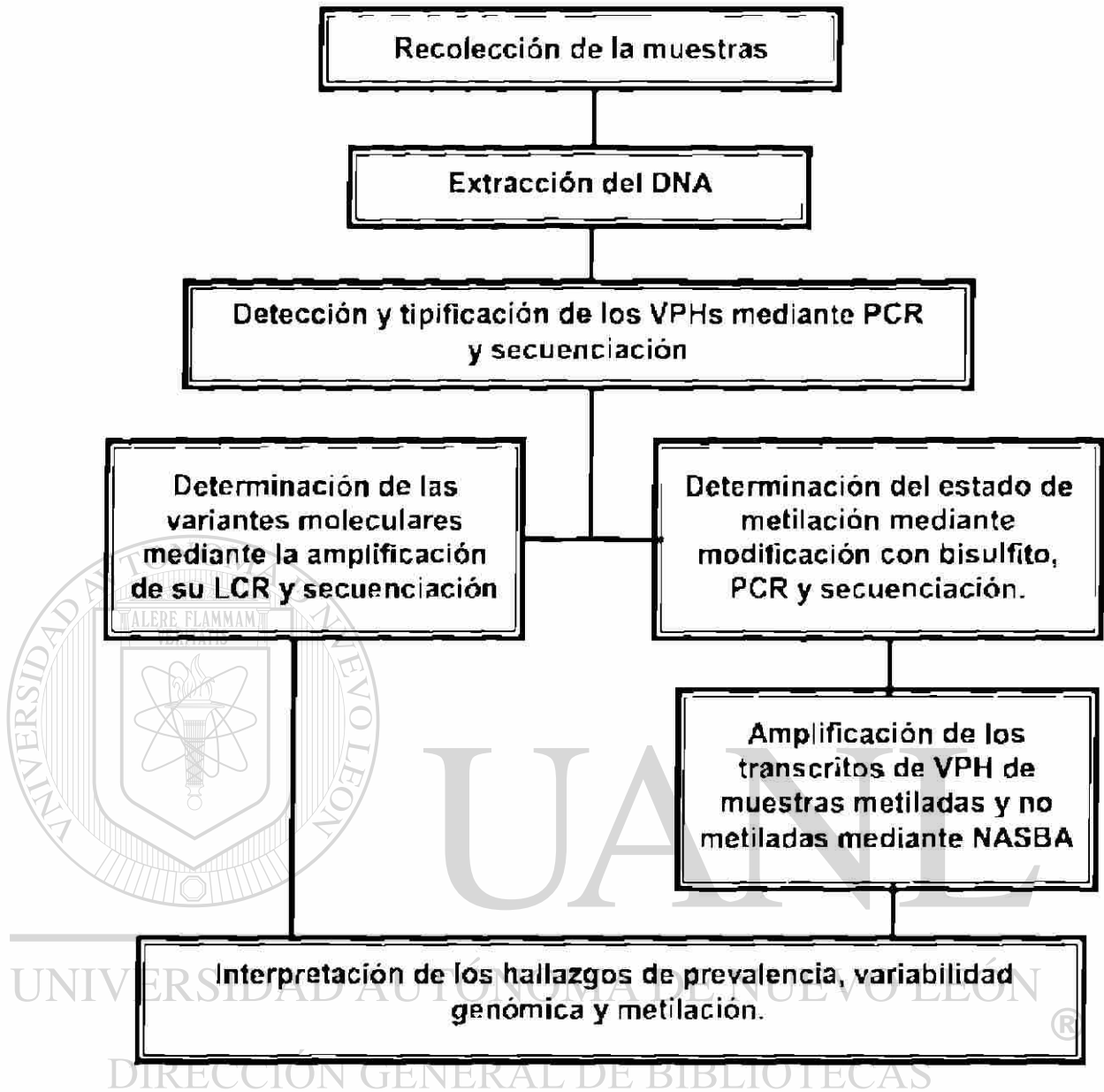


Figura 9. Estrategia experimental general. Se ilustran los pasos que comprenden la estrategia experimental realizada en este trabajo.

CAPÍTULO IV

MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Área de trabajo, reactivos y equipo.

4.1.1. Área de trabajo: El trabajo experimental 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 U.A.N.L. Este se apoyó con estancias en los laboratorios de los Drs. Luis Villarreal y Hans Ulrich Bernard de la Universidad de California Irvine, CA, EUA.

4.1.2 Material Biológico: Las muestras cervicales se obtuvieron a partir de mujeres que asistieron a la consulta de los diferentes centros de salud pertenecientes a la Secretaría de Salud en el área metropolitana de Monterrey durante el verano del 2002 (julio y agosto). Estas muestras forman parte de un proyecto de colaboración entre el Departamento de Bioquímica y la Secretaría de Salud del estado de Nuevo León. De cada una de las mujeres a analizar se obtuvieron células cervicales tomadas con un cepillo vaginal, se depositaron en un medio de transporte (PreservCyt) y fueron conservadas a 4°C hasta su utilización.

4.1.3 Materiales de plástico: Los tubos de microcentrifuga (de 0.2, 0.5, 1.5 y 2.0 ml), así como las micropipetas de precisión de volumen variable de 2, 10, 20 200 y 1000 μ l fueron obtenidos de Eppendorff Corporation (Westbury, NY, EUA). Platos de 96 pozos para PCR y sus respectivas tapas fueron adquiridos de USA Scientific (Ocala, FL, EUA). Las puntillas con filtro resistentes al aerosol (de 0.01, 0.2, 1.0 ml) fueron adquiridas de Molecular BioProducts (San Diego, CA, EUA). Las puntillas para las micropipetas de precisión (de 0.01, 0.2, 1.0 ml) fueron adquiridas a través de la compañía Fisher Scientific. Los tubos cónicos de polipropileno (de 15 y 50 ml) fueron comprados a la compañía Corning Corporation (Chicago, IL, EUA), mientras que los guantes de látex fueron comprados a Microflex (Reno, NV, EUA).

4.1.4 Reactivos: Para la conservación de las muestras se utilizó el reactivo PreservCyt adquirido de Cytoc Corporation (Boxborough, MA, EUA). Para el aislamiento de DNA se utilizó EDTA, SDS, NaCl, trizma base, y fenol, adquiridos de Sigma Chemical Company (Saint Louis, MO, EUA); así como ácido clorhídrico, cloroformo, alcohol isoamílico, isopropanol y etanol, de Merk de México. La enzima *Proteinasa K* fue adquirida de Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis, IN, EUA)

Los oligonucleótidos utilizados fueron adquiridos de la compañía Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, EUA). El buffer de reacción, cloruro de magnesio y las enzimas *Taq DNA Polimerasa*, *Go Taq DNA polimerasa*, así como *Taq Gold*

DNA polimerasa fueron de Promega (Madison, WI, EUA), mientras que los dNTPs de Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, EUA).

Para la electroforesis en gel de agarosa se utilizó agarosa, trizma base, EDTA, ácido bórico, azul de bromofenol, xilencianol y bromuro de etidio de Sigma Chemical Company. Como patrones de referencia de tamaño en las electroforesis, se utilizaron las escaleras de marcadores de DNA de 100 y 1000 pb adquiridos a la compañía Invitrogen.

Para llevar a cabo la clonación de los productos amplificados se utilizó el estuche comercial de Invitrogen TOPO TA cloning, así como las células calcio-competentes TOP 10 de la misma compañía.

Para la purificación de los productos amplificados o clonados se utilizaron las enzimas SAP y Exo I pertenecientes a la compañía USB (Cleveland, OH, EUA) así como también el estuche comercial QIAquick PCR purification de Qiagen Corporation (Valencia, CA, EUA). Para los productos purificados a partir de agarosa se utilizó el estuche comercial de Qiagen QIAquick Gel extraction, de la misma compañía.

La reacción de secuenciación se realizó utilizando el estuche comercial ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Versión 3.1 de la compañía Applied Biosystems (Foster City, CA, EUA). Para la precipitación de los productos secuenciados se utilizó acetato de sodio y etanol de la compañía Sigma.

Para la reacción de modificación del DNA se utilizaron hidróxido de sodio de la compañía Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, EUA), así como también bisulfito de sodio e hidroquinona de la compañía Sigma.

El RNA fue extraído con un estuche comercial de la compañía Organon Teknika (Holanda). La reacción de amplificación de los ácidos nucleicos fue realizada con un estuche comercial Pre Tec HPV-profeser de la compañía Norchip (Noruega).

4.1.5 Equipo:

En el aislamiento de DNA se utilizó una microcentrifuga Eppendorf modelo 5415D (Hamburg, Alemania), un vórtex modelo 37600 de Thermolyne (Dubuque, IA, EUA), y una balanza granataria Sartorius modelo CP2202S (Cambh, Göttingen, Alemania).

Los termocicladores utilizados fueron: Termociclador Mastercycler gradient y Mastercycler de 96 pozos de Eppendorf, así como también el PTC-200 de 96 pozos JM-Research.

Para analizar los productos amplificados por la PCR, se utilizaron cámaras de electroforesis horizontales de diferentes tamaños de CBS Scientific Company (Del Mar, CA, EUA), y una fuente poder de Gibco-BRL modelo 250 (Gaithersburg, MD, EUA).

Para analizar los geles de agarosa se utilizó el equipo de fotodocumentación electroforética y el sistema de análisis (EDAS) 290 de la compañía Kodak (New Haven, CT, EUA).

El análisis de los transcritos de VPH fue realizado en una termociclador tiempo real Easy-Q de la compañía Organon Teknika (Holanda).

4.1.6 Apoyo computacional:

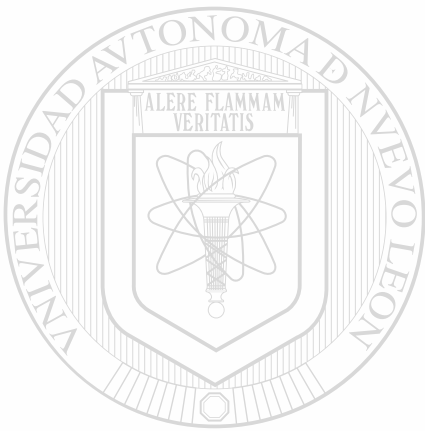
El procesamiento de datos fue realizado en una computadora DELL modelo Dimension 4500 y un sistema de análisis dimensional de geles compatible con PC, constituido de una cámara digital, una fuente de luz UV y una computadora (EDAS, Kodak)

El procesador de texto utilizado fue *Microsoft Word 2000* (Microsoft Corporation), el de gráficos fue *Microsoft Power Point 2000* (Microsoft Corporation) y *Adobe Photoshop Limited Edition 2.5.1* (Adobe System Incorporated).

Los programas computacionales de Biología Molecular empleados fueron: *Edit Seq*, *Primer Select*, pertenecientes al procesador Lasergene de DNASTar (Madison, WI, EUA), así como 1D Imagen Análisis (Kodak).

Los programas utilizados por vía INTERNET fueron: *Entrez* (National Center for Biotechnology Information (NCBI), BLAST Network Service (Blaster),

GenBank (NIH, Estados Unidos Americanos), Align (Institut de Génétique Humaine, Montpellier France), Chromas versión 1.45 (Queensland, Australia) y Meth primer (San Francisco, CA, EUA).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2 Métodos

4.2.1 Colección de las muestras.

Durante los meses de Julio y Agosto del 2002, mujeres que acudieron a la consulta en los diferentes centros de salud pertenecientes a la Secretaría de Salud del Estado de Nuevo León, del área metropolitana de Monterrey, fueron invitadas a participar en este estudio. A todas ellas se les explicó en que consistía el mismo y a las que aceptaron participar, se les pidió que contestaran un cuestionario clínico, así como que firmaran una carta de consentimiento informado.

La muestra consistió de células cervicales tomadas con un cepillo vaginal disueltas en un medio de conservación, mantenidas a 4°C hasta su utilización. En adición, la Secretaría de Salud tomó una muestra adicional con la finalidad de practicar el análisis a nivel citológico.

4.2.2 Procesamiento de la muestra.

Se recolectaron y analizaron 1282 muestras cervicales. Las muestras conservadas en preservCyt fueron centrifugadas a 14000 rpm durante 5 min y colocadas en una placa de calentamiento a 37°C por unos minutos, con la

finalidad de eliminar el metanol, el cual es el principal componente del preservCyt. Una vez obtenida la pastilla celular, se continuó con la extracción del DNA.

4.2.3 Extracción de DNA genómico a partir de células cervicales. Se

extrajo el DNA genómico mediante la técnica con *proteínasa K* y fenol-cloroformo, que consiste en la lisis simultánea de las células cervicales utilizando a la enzima *proteínasa K* y el detergente SDS. El DNA se purificó posteriormente por extracciones con fenol-cloroformo y finalmente se recuperó por precipitación con isopropanol y acetato de amonio. El procedimiento que se siguió fue el siguiente:

Las células se lisaron con 500 μ l de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl, 0.5 % SDS, 10 mM EDTA, 50 mM NaCl), se adicionó la enzima *Proteínasa K* (10 mg/ml) mezclando por varios segundos y dejando a 56°C de 1 a 2 hrs o a 37°C toda la noche. Posteriormente se agregaron volúmenes iguales de fenol saturado (500 μ l) y de SEVAG (Cloroformo, 24: Alcohol isoamílico, 1). El contenido del tubo se homogenizó por completo utilizando un vórtex. Enseguida se centrifugó a 14,000 rpm por espacio de 15 min. Se recuperó la fase acuosa y se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 ml. Se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol y 1/10 de acetato de amonio y se dejó reposar por espacio de una hora a -20°C. Una vez transcurrido este tiempo se centrifugó a 14000 rpm en una microcentrifuga por 30 min y la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%.

Se centrifugó nuevamente, se decantó el etanol, se secó el DNA y finalmente se resuspendió en TE 1X (Tris-HCl 10 mM a pH7.5 y EDTA 1 mM).

4.2.3.1 Verificación de la calidad y la concentración del DNA. Se realizaron diluciones 1:10 de algunos DNAs para verificar su cantidad e integridad en geles de agarosa al 0.8%, utilizando estándares de DNA de concentración conocida. Algunos de ellos fueron también leídos al espectrofotómetro. Debido a la gran cantidad de muestras, para corroborar la calidad y cantidad del DNA extraído, se optó por probar su amplificación por PCR con un gen de expresión invariable ("house-keeping"), el de la β -actina.

4.2.3.2 Amplificación y detección del gen β -actina mediante PCR.

Para la amplificación de la región del gen β -actina se utilizaron los iniciadores descritos por Ehrlich y Bugawan,¹²⁷ estos fueron los siguientes:

Oligo GH 26: 5'- GTGCTGCAGGTGTAAACTTGTACCAG -3'

Oligo GH 27: 5'- CACGGATCCGGTAGCAGCGGTAGAGTTG -3'

Las muestras se amplificaron en las condiciones óptimas encontradas experimentalmente y descritas a continuación: 2 μ l de cada muestra fueron adicionadas a 25 μ l de la mezcla de reacción de la PCR conteniendo 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0.4 pMol de cada oligo y 1 U de *Taq DNA polimerasa* (Promega, WI, EUA). La PCR fue llevada a cabo usando el termociclador PTC-200 (MJ-Research, Inc. MA, EUA) bajo las

siguientes condiciones: después de 5 min del paso de desnaturalización a 94°C, se siguieron 40 ciclos a 94°C por 30 s, 45°C por 30 s y 72°C por 1 min, para finalmente realizar una extensión final a 72°C por 7 min.

4.2.3.2.1 Verificación de la amplificación en un gel de agarosa. Las muestras amplificadas se corrieron en un gel de agarosa al 2%. Cinco µl del producto amplificado más 1 µl de jugo azul al 6X se sometieron a electroforesis junto con un marcador de peso molecular adecuado (escalera genómica de 100 pb) para verificar el tamaño de la banda obtenida. La electroforesis se realizó en una cámara MGU-202T (C.B.S. Scientific, Co. CA, EUA) a 120 Volts (V) por un tiempo aproximado de 45 min. El buffer utilizado tanto para preparar el gel, como para llenar la cámara de electroforesis fue TAE 1X. Veinticinco µl de bromuro de etidio (1 mg/ml) fueron adicionados al gel de agarosa, así como al buffer de corrida. El gel se observó en el aparato EDAS 290 a través del programa computacional Kodak 1D.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.4 Detección del virus del papiloma humano mediante PCR.

Dos sistemas consensos y anidados fueron usados para la detección del VPH. El sistema universal MY09-MY11/Gp5+-Gp6+ y el sistema LCR-E7/pU1M-pU2R. El primer sistema amplifica una banda de aproximadamente 120 pb correspondiente a un fragmento del gen L1, mientras que el segundo sistema amplifica una banda de ~240 pb correspondiente al segmento perteneciente a los genes E6 y E7.

4.2.4.1 Detección del número de copias con ambos sistemas. Las líneas celulares CaSki (500 copias) y SiHa (1-2 copias), las cuales son VPH 16 positivas, fueron crecidas a confluencia y tripsinizadas para su posterior utilización. El DNA de estas células fue extraído mediante la técnica *proteínasa K-fenol/cloroformo* anteriormente mencionada. El DNA fue verificado en un gel de agarosa al 0.8% y posteriormente cuantificado al espectrofotómetro. DNA plasmídico conteniendo el genoma completo del VPH 16 (pBR-VPH 16) también fue cuantificado y utilizado. Se realizaron diluciones seriadas a partir de 40ng/μl hasta 0.004 fg/μl y se sometieron a amplificación con los oligonucleótidos MY09-MY11/Gp5+-Gp6+ así como I CR-F7/pU1M-pU2R. El mínimo número de copias amplificadas fue determinado con ambos sistemas.

4.2.4.2 Detección del VPH en muestras cervicales con el sistema MY09-MY11/Gp5+-Gp6+. Para la detección del VPH en las muestras cervicales se utilizó una PCR anidada (nPCR), basada en dos juegos de oligonucleótidos consensos: el sistema MY09/MY11 (Manos y cols., 1989)¹²⁸ y el sistema Gp5+/Gp6+ (Snijders y cols., 1990),¹²⁹ descritos a continuación.

Bajo condiciones de esterilidad, 25 ml de la mezcla de reacción de la PCR usando los oligonucleótidos MY09 (5'-CGTCCMARRGGWACTGATC-3') y MY11 (5'-GCMCAGGGWAATAAYAATGG-3'), conteniendo 50 mM de KCl, 10 mM Tris-Cl, pH 8.4, 0.001% de gelatina, 2 mM de MgCl₂, 200 mM de cada dNTP, 0.04 pMol de cada oligo, y 1 U de *Taq DNA polimerasa* (Promega, WI,

EUA), fueron mezclados junto con 2 µl de las muestras positivas para β-actina. Cuarenta ciclos de amplificación fueron llevados a cabo con un paso de desnaturalización a 94°C por 30 s, un alineamiento a 55°C por 30 s y una extensión a 72°C por 1 min. Inicialmente se realizó un paso de desnaturalización a 94°C por 4 min y al final se incluyó una extensión a 72°C por 7 min. Controles negativos para la PCR fueron utilizados cada 5 muestras.

Después de la primera ronda de amplificación, 1/10 de esta mezcla fue transferida a nuevos tubos de PCR para llevar a cabo la segunda PCR con los oligonucleótidos Gp5+ (5'-T11GTTACTGTGGIAGATACYAC-3', donde Y=T o C) y Gp6+ (5'-GAAAAATAACTGTAAATCATATTC-3'), conteniendo buffer de reacción, 0.001% de gelatina, 200 mM de dNTPs, 4 mM de MgCl₂, 1 pMol de cada oligo y 1 U de *Taq DNA polimerasa*. Controles negativos para VPH conteniendo DNA de hígado de rata, así como controles negativos para la PCR

fueron colocados también cada 5 muestras. La reacción fue sujeta a un paso de desnaturalización inicial a 98°C por 4 min y a 40 ciclos, cada uno consistiendo de 94°C por 1 min, 40°C por 1 min, 72°C por 2 min y un paso final de extensión a 72°C por 5 min. Lo anterior en un termociclador Eppendorf.

4.2.4.3 Detección del VPH en muestras cervicales con el sistema LCR-E7/pU1R-pU2R. Para detectar VPHs fueron utilizados un juego de oligonucleótidos consensos, los cuales amplifican un fragmento entre la región larga de control y el gen F7. Estos iniciadores LCR-s: 5'-AAGGGAGTAACCGAAAACGGT-3' y E7-As: 5'-TCATCCTCCTCCTCTGAG-3',

descritos por Noda y cols,¹³⁰ fueron utilizados como oligonucleótidos externos en esta primera ronda de amplificación, bajo las siguientes condiciones:

Cinco microlitros de muestras positivas para β -actina fueron adicionadas a 20 μ l de la mezcla de reacción de la PCR conteniendo 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 4 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 0.01 pMol de cada oligo y 1 U de *Taq DNA polimerasa* (Promega, WI, EUA). La PCR fue llevada a cabo usando el termociclador PTC-200 (MJ-Research, Inc) bajo las siguientes condiciones: después de 2 min del paso de desnaturalización a 95°C, se repitieron 35 ciclos a 95°C por 45 s, 55°C por 20 s y 74°C por 45 s. Hubo un paso final a 74°C por 5 min. Esto para la primera ronda de amplificación.

La segunda PCR fue llevada a cabo con los oligonucleótidos consensos pU-1M, 5'-TGTCAAAACCGTTGTGTCC-3' y pU-2R, 5'-GAGCTGTCGCTTAATTGCTC-3' (Fujinaga y cols, 1991)¹³¹. La amplificación fue llevada a cabo tomando 1/10 del primer producto amplificado. Bajo condiciones de esterilidad, se realizó la mezcla de reacción para esta PCR conteniendo 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1.5 mM MgCl₂, 200 μ M de cada dNTP, 1 pMol de cada oligonucleótido, y 1 U de *Taq DNA polimerasa* (Promega, WI, EUA). Cinco ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 45°C por 1 min, y extensión a 72°C por 2 min, seguidos de 5 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineamiento a 48°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min; 20 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, el alineamiento a 55°C por 1 min y una extensión a 72°C por 1 min; finalmente

una extensión a 72 °C por 5 min. El producto amplificado por esta reacción es de 240-270 pb.

4.2.4.4 Verificación de la amplificación en un gel de agarosa.

Después de la amplificación (ya fuese con cualquiera de los 2 sistemas anteriormente descritos), 1/10 de cada reacción fue corrida en un gel de agarosa al 2% en TAE por espacio de 1h, teñido con bromuro de etidio y observado en un equipo de fotodocumentación EDAS 290 (compañía Kodak).

4.2.4.5 Purificación de los productos amplificados. Con la finalidad de eliminar los dNTPs y los oligonucleótidos, los productos amplificados positivos para VPH fueron purificados mediante el siguiente sistema. Se adicionaron 1 µl de *fosfatasa alcalina de camarón (SAP)* y 0.5 µl de *Exonucleasa I (Exo I)* (PCR

Product Pre-sequencing Kit, USB, Cleveland, OH) en buffer de reacción a 9 µl del producto amplificado en un tubo de PCR para obtener un volumen final de 12.5 µl. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf a 37°C durante 1 h, posteriormente las enzimas fueron inactivadas durante 30 min. a 72°C.

4.2.4.6 Secuenciación directa de los productos amplificados. Los productos purificados fueron sometidos a una reacción de secuenciación utilizando el estuche comercial ABI PRISM Big Dye terminator cycle sequencing (PE Applied Biosystem, CT, USA) versión 3.1. Los oligonucleótidos utilizados

para la secuenciación fueron los mismos que se utilizaron en la segunda ronda de amplificación. La reacción consistió de 2 μ l del buffer de reacción (5X), 2 μ l del respectivo oligo (0.8 μ M), 1.5 μ l del terminador, 1.5 μ l del producto amplificado y el resto de agua hasta obtener un volumen final de 10 μ l. La reacción se sometió a un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 3 min, seguido de 24 ciclos a 96°C por 30 s, 50°C por 15 s y 60°C a 4 min. Una vez terminado este proceso, la reacción fue precipitada con una mezcla conteniendo 3 μ l acetato de sodio 3 M pH 4.6, 62.5 μ l de etanol desnaturalizado al 95% y 14.5 μ l de agua por muestra. Una vez adicionada esta mezcla, la muestra fue agitada al vórtex y se dejó reposar a temperatura ambiente por 15 min. Acto seguido se centrifugó por 20 min a max. velocidad, y se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue lavada con 250 μ l de etanol al 70%, por 5 min a max. velocidad. Finalmente, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar al aire. La reacción de secuenciación fue analizada en un secuenciador automatizado ABI Prism 377 (PE Applied Biosystem, CT, EUA).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.2.4.7 Clonación de los productos amplificados. Las muestras cuyas secuencias resultaron estar traslapadas (debido a la presencia de 2 o más DNAs presentes en la misma muestra) fueron repetidas y clonadas. La clonación se llevó a cabo con la ayuda del estuche comercial TOPO TA cloning (Invitrogen, CA, EUA). Los productos amplificados frescos fueron ligados al vector pCR®4-TOPO a temperatura ambiente por 25 min y fueron transformados en células competentes TOP 10 (15 μ l) y se plaquearon en placas con medio LB y canamicina (50 μ g/ml) como antibiótico resistente. Las

colonias se dejaron crecer a 37°C por 18 hrs. La selección de las colonias positivas fue mediante una PCR utilizando los oligos universales M13F (5'-GTAAACGACGGCCAG-3') y M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). La amplificación fue llevada a cabo en 12.5 µl de una solución conteniendo 1X del buffer de reacción, 200 mM de cada dNTP, 2 mM de MgCl₂, 0.4 pMol de cada oligo y 1 U de *Taq DNA polimerasa*. La amplificación se llevó a cabo en 27 ciclos (cada uno constando de un paso de desnaturalización a 94°C por 30 s, seguidos de un alineamiento a 55°C por 30 s y una extensión a 72°C por 45 s), con un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 7 min y otro de extensión final a 72°C por 7 min. Los productos de la PCR fueron corridos en un gel al 2%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados a la luz UV.

4.2.4.8 Secuenciación de los productos clonados. Los productos amplificados fueron purificados con las enzimas *Exo I* y *SAP*. La reacción de secuenciación se llevó a cabo con el oligonucleótido M13F, bajo las condiciones ya descritas previamente.

4.2.4.9 Análisis de las secuencias y tipificación de las muestras VPH positivas. Los cromatogramas de las secuencias fueron analizados mediante el programa *Chromas* versión 1.45 (Queensland, Australia). Una vez analizado el cromatograma, la secuencia fue copiada y enviada al programa BLAST en línea, con el que se realizó la comparación de la secuencia. Los tipos de VPH fueron identificados con base en la similitud a la secuencia de VPH depositada

en el GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/GenbankOverview.html>), la cual debería de ser de más del 80%.

4.2.5 Detección de las variantes moleculares de los VPHs 16, 18, 31 y 35.

4.2.5.1 Obtención de las muestras analizadas. Un total de 161 muestras mexicanas positivas para los VPH 16, 31, 18 y 35 fueron utilizadas para analizar su variabilidad genómica. En adición a las muestras mexicanas, se incluyeron también 13 muestras colectadas en Oslo, Noruega, 16 muestras sudafricanas (Ciudad del Cabo, Sudáfrica) provenientes de dos grupos étnicos (negros puros y mezclas entre ellos), así como también muestras del sur de California (Los Ángeles, EUA), derivadas de lesiones neoplásicas anales de pacientes positivos para la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Para los tres primeros estudios (México, Noruega y Sudáfrica), el diagnóstico citológico fue realizado subsecuentemente a la obtención de éstas y el resultado clínico no influyó en la inclusión para este estudio.

4.2.5.2 Diseño de oligos y amplificación de la LCR de los diferentes VPHs. Un segmento importante de la región LCR fue amplificado con iniciadores específicos para cada tipo de VPH. Los oligonucleótidos fueron diseñados mediante la ayuda del programa *Primer Select* (Madison, WI, EUA), a excepción de los oligonucleótidos que amplifican el VPH-16 y VPH-18, ya que para éstos se usaron los oligonucleótidos reportados por Ho y cols.¹³² y Ong y cols.,¹³³ respectivamente (ver tabla 2), y probados con controles positivos

(plásmidos VPH-16, VPH-31 y VPH-35, así como la línea celular HeLa, la cual es VPH-18 positiva). El mínimo número de copias fue determinado como se mencionó anteriormente.

La mezcla de reacción para la amplificación consistió de 20 mM Tris (pH 8.0), 100 mM KCl, 200 μ M de cada desoxiribonucleosido trifosfatado, 2 mM $MgCl_2$, 10 μ M de cada de los oligos y 1 U de *Taq DNA polimerasa* (Promega, WI, EUA); mientras que para la amplificación del VPH 16 se utilizó la enzima *Go Taq DNA Polimerasa* (Promega, Madison, WI). La amplificación constó de cuarenta ciclos en un termociclador Eppendorff Master Cycler (Eppendorff, Hamburg, Germany). con un paso de desnaturalización a 94°C por 30 s, uno de alineamiento a 60°C durante 30 s y uno de extensión a 72°C durante 1 min., incluyendo un paso inicial de desnaturalización de 4 min y uno de extensión final de 5 min.

Tabla 2. Datos de los oligonucleótidos utilizados para la detección de las variantes moleculares.

Tipo de VPH	Oligo	Localización	Secuencia (5'-3')
VPH-16	7478	7478-7477	GGGGTACCTCGGTTCATGCTTTTGGC
	7841	7851-7841	GGTCTAGACGGTTTGCACACACCCATGT
VPH 31	VPH31-8aF	7527-7550	AGTAGTCTCGGGTTTTGGTTTC
	VPH31-8aR	114-137	CCGAGGTCTTCTGCAGGATTTTT
VPH 18	7485	7465-7484	TGGGTTGCCTTGGCTTATG
	7805	7806-7825	CGGTTGCAIAAACTATGTAT
VPH-35	VPH35LCR-F	7146-7172	TATATTATGTGTTGTGGTGCCTGTTTG
	VPH35LCR-R	163-187	AATTTGATGGATGCTTCTTCTACC
	VPH35LCRa-F	7418-7439	CGATTTCCGTTGCTGTGGTAAG
	VPH35LCRa-R	11-33	CGTTTTCCGGTCACTCCCTGTTTT

4.2.5.3 Verificación de la amplificación en un gel de agarosa.

Después de la amplificación, 1/10 de cada reacción fue corrida en un gel de

agarosa al 2% en TAE por espacio de 1h, teñido con bromuro de etidio y observado en un equipo de fotodocumentación EDAS 290 (compañía Kodak).

4.2.5.4 Purificación de los productos amplificados. Con la finalidad de eliminar los dNTPs y los oligonucleótidos, los productos amplificados que tenían una sola banda fueron purificados mediante el sistema *SAP-Exo I*. Los productos fueron tratados con 1 μ l de *fosfatasa alcalina de camarón (SAP)* y 0.5 μ l de *Exonucleasa I (Exo I)* (PCR Product Pre-sequencing Kit, USB, Cleveland, OH), 1 μ l del buffer de reacción junto con 9 μ l del producto amplificado en un tubo de PCR. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Eppendorf a 37°C durante 1 h. Posteriormente, las enzimas fueron inactivadas durante 30 min a 72°C. Las muestras cuyas amplificaciones tenían más de una sola banda fueron purificadas mediante el estuche comercial QIAquick (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones dadas por el mismo. Estas instruyen en cortar la banda correspondiente, eliminar la agarosa y pasar el producto amplificado por una columna de sílica, para posteriormente eluirlo en 40 μ l de TE. Dos μ l de los productos purificados, así como del marcador de peso molecular fueron corridos en un gel de agarosa al 2% con la finalidad de observar su calidad y de realizar una semicuantificación de ellos.

4.2.5.5 Secuenciación directa de las LGR amplificadas de los diferentes VPHs. Una vez purificados los productos de PCR, éstos fueron secuenciados utilizando el estuche comercial BigDye™ Terminator Cycle

Sequencing (Perkin Elmer Applied Biosystems, CA, EUA). Por cada muestra, dos productos independientes de PCR fueron secuenciados en ambas orientaciones y con oligos internos con la finalidad de excluir artificios de la PCR. Cambios en la secuencia que fueron encontrados al menos dos veces en la misma muestra fueron contados como variantes.

4.2.5.6 Análisis de la variabilidad genómica en los VPHs. Los análisis de las secuencias se realizaron con el programa ALIGN via Internet (servidor GENESTREAM) publicado por Pearson y cols.,¹³⁴ para comparar las variantes del VPH con las secuencias de referencia. En este estudio, las posiciones nucleotídicas del VPH-18, VPH-31 y VPH-35 fueron numeradas acorde a las secuencias de referencia NC 001357, NC 001527 y X74477, respectivamente. La secuencia del VPH-16, así como las posiciones nucleotídicas, fueron numeradas de acuerdo a la última actualización de la secuencia genómica del VPH-16 de referencia, conocida como VPH-16 R (Los Alamos National Laboratory, <http://hvp-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/>). La secuencia de referencia para el VPH-35 usada en este estudio fue la del VPH-35H, debido a los múltiples errores en la secuencia original. Las secuencias nucleotídicas derivadas de este estudio fueron enviadas al GenBank, bajo los números de acceso del AY453865 al AY454064.

4.2.5.7 Análisis filogenético de las variantes moleculares. Las variantes del VPH-16 y VPH-18 fueron comparadas con aquellas que forman las ramas filogenéticas ya publicadas anteriormente (Ho y cols., 1991,1993;

Ong y cols., 1993; Stewart y cols., 1996).^{132,133,135,136} El análisis filogenético de las variantes del VPH-31 y del VPH-35 fue realizado usando el programa MEGA versión 2.1 publicado por Kumar y Gadagkar (2001).¹³⁷ Los árboles filogenéticos fueron determinados usando el método "unweighted pair-group" con promedio aritmético (UPGMA) y el método "Neighbor joining" (NJ).

4.2.6 Determinación del estado de metilación en los VPHs.

4.2.6.1 Muestras testigos y controles. Las líneas celulares VPH-16 positivas, SiHa y CaSki fueron utilizadas como controles positivos para este experimento. Las muestras clínicas utilizadas fueron provistas por tres diferentes fuentes: las muestras Noruegas, las cuales consistieron de 29 muestras asintomáticas, 17 con NICs grados I a III, y 32 con cáncer cervical; las muestras mexicanas, obtenidas de diferentes centros de salud del área metropolitana de Monterrey: 34 muestras asintomáticas y 13 con cáncer cervical; finalmente, las muestras obtenidas en el Centro para el Cáncer en la Universidad de California, Irvine: dos muestras con cáncer cervical.

4.2.6.2 Modificación del DNA con bisulfito de sodio. Para llevar a cabo el tratamiento con bisulfito de sodio, de 50 a 1000 ng de DNA de la muestra, fueron suplementadas con un microgramo de DNA de esperma de salmón en un volumen total de 18 μ l, y fueron desnaturalizados con 2 μ l de hidróxido de sodio (NaOH) 3M e incubadas a 37°C. Después de la desnaturalización, 278 μ l de bisulfito de sodio 4.8M y 2 μ l hidroquinona 100 mM

fueron adicionados e incubados en un termociclador Eppendorff durante 20 ciclos, consistiendo cada uno de 15 min a 55°C y 30 s a 95°C. El DNA modificado fue purificado con la ayuda del estuche comercial QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones recomendadas. El DNA modificado fue desulfonatado por la adición de 5.5 µl de NaOH 3M, 5 µg de glucógeno y una incubación a 37°C por 15 min. El DNA fue precipitado con 5.6 µl de acetato de sodio 3M y 150 µl de etanol al 100%. La pastilla fue posteriormente lavada con etanol al 70% y disuelta en 30 a 50 µl TE.

4.2.6.3 Diseño de oligonucleótidos y amplificación del DNA

modificado. Las secuencias de los oligos fueron diseñados de acuerdo a la secuencia de referencia del VPH-16 (Los Alamos National Laboratory, <http://hvp-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/>), mediante la conversión de todas los residuos de citocinas en uracilos. El DNA modificado fue amplificado en 3 diferentes amplicones: Parte del gen L1 y el extremo 5' de la LCR fue amplificado con los oligonucleótidos 16msp3F (posición 7049-7078) 5'-AAGTAGGATTGAAGGTAAATTAATAATTA-3' y 16msp3r (posición 7590-7560) 5'-AACAAACAATACAAATCAAAAAACAAAA-3'; el potenciador del VPH-16 con los oligos 16msp4F (posición 7465-7493) 5'-TATGTTTTTTGGTATAAAATGTGTTTTT-3' y 16msp7R (posición 7732-7703) 5'-TAAATTAATTAACAAACCAAAAATATAT-3'; y el promotor del VPH-16 con los oligonucleótidos 16msp5F (posición 7748-7777) 5'-TAAGGTTTAAATTTTAAGGTTAATTAAT-3' y 16msp8R (posición 115-86) 5'-ATCCTAAAACATTACAATTCTCTTTTAATA-3'. Todos estos oligos fueron

probados con un DNA control (DNA de células CasKi y SiHa) con la finalidad de verificar la amplificación del DNA modificado. La PCR fue llevada a cabo en un volumen total de 25 μ l conteniendo 0.2 mM de cada uno de los 4 dNTPs, 10 pMol de los oligos, 2 mM de $MgCl_2$ y 1 U de la enzima *Ampli Taq Gold* (Perkin-Elmer). La PCR fue iniciada a 94°C por 1 min, seguida de 40 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 10 s, un alineamiento a 58 °C por 30 s y una extensión a 68 °C por 1 min) con una extensión final a 68 °C por 7 min. La presencia de los productos fue verificada en un gel de agarosa observados bajo luz ultravioleta.

4.2.6.4 Clonación y secuenciación de los productos amplificados.

Una vez confirmados los amplicones, estos fueron clonados mediante la ayuda del estuche comercial TOPO TA cloning (Invitrogen, CA, EUA). Los productos amplificados frescos fueron ligados al vector pCR®4-TOPO a temperatura ambiente por 25 min y fueron transformados en células competentes TOP 10 (15 μ l) y se plaquearon en placas con medio LB y kanamicina (50 μ g/ml). Las colonias se dejaron crecer a 37°C por 18 hrs. Las colonias positivas fueron seleccionadas mediante PCR utilizando los oligonucleótidos universales M13F y M13R bajo las siguientes condiciones: un paso de desnaturalización a 94°C por 7 min, seguida de 27 ciclos de amplificación (desnaturalización a 94 °C por 30 s, un alineamiento a 55 °C por 30 s y una extensión a 72 °C por 45 s) con una extensión final a 68 °C por 7 min. La presencia de los productos fue verificada en un gel de agarosa observados bajo luz ultravioleta. Los productos amplificados de las colonias positivas fueron purificados mediante el sistema

SAP-Exo I. La secuenciación se realizó utilizando el estuche comercial BigDye™ Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer Applied Biosystems, CA) bajo condiciones descritas anteriormente.

4.2.6.5 Análisis de las secuencias y determinación del patrón de metilación. Las secuencias y sus respectivos cromatogramas fueron analizados bajo los programas computacionales Cromas versión 1.45 y ALING via internet. La secuencia de referencia utilizada fue la del VPH 16R (Los Alamos National Laboratory, <http://hpv-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/>), en donde todas las citocinas a excepción de las CpGs, fueron convertidas a timinas y por comparación de secuencia, las CpGs metiladas pudieron ser detectadas.

4.2.6.6 Análisis estadístico. Para explorar los datos, fueron usadas estadísticas tabulares y descriptivas. Representaciones gráficas de la frecuencia de la metilación de las CpGs fueron estimadas a partir de los datos. Para algunos sitios, en los que el DNA no pudo ser amplificado, los datos fueron descartados para estos análisis. La frecuencia de la metilación para cada sitio CpG, CpA y CpT fue comparada entre tres grupos de pacientes: cáncer, NICs y especímenes de mujeres infectadas asintóticamente (lesiones no identificables, NIL). La prueba exacta de Fisher fue usada para probar la hipótesis de que las frecuencias de la metilación de cánceres y NICs eran cada una mucho más grandes que las frecuencias de la metilación de especímenes de mujeres con NIL. Un total de 95 comparaciones estadísticas fueron llevadas

a cabo y se ajustó el nivel de significancia para las pruebas estadísticas usando el ajuste de Bonferroni para múltiples comparaciones.

4.2.7 Detección de los transcritos E6/E7 mediante la técnica NASBA.

4.2.7.1 Extracción de RNA a partir de muestras cervicales, amplificación y detección de las mismas. Se recurrió a una nueva tecnología muy sensible para detectar transcritos provenientes del VPH, que se basa en tres pasos fundamentales:

- 1) la obtención del ácido ribonucleico (RNA),
- 2) la amplificación de dicho ácido y,
- 3) la detección del mismo.

El RNA fue obtenido mediante la ayuda del estuche comercial Nucleic Acid Isolation (Organon Teknika, Holanda) mediante la técnica conocida como "BOOM",¹³⁶ la cual esta basada en la adición de una agente caotrópico como lo es el tiocianato de guanidina, el cual tiene propiedades que inactivan a las nucleasas y lisan las células. A su vez se emplea sílica, la cual unen a los ácidos nucleicos en la presencia de este agente. Se siguieron las instrucciones recomendadas por el fabricante del estuche comercial y el RNA fue resuleto en un gel de agarosa al 1% con formaldehido y formamida, con un buffer de corrida de MOPs. Para su visualización se tiñó con bromuro de etidio y se irradió con luz ultravioleta.

Para la amplificación del RNA se utilizó un estuche diseñado y obsequiado por Norchip® (Klokkarstua, Noruega), que se basa en la técnica conocida como NASBA-tiempo real, que es un método de amplificación isotérmica que amplifica RNA en una manera análoga a la replicación de los retrovirus. La reacción contiene oligonucleótidos y tres enzimas: *AMV-RT*, *RNasa H*, *T7 RNA polimerasa*, para amplificar un blanco específico. La reacción de Nasba empieza con el alineamiento del primer oligo al RNA blanco (ver figura 10). Este oligo contiene en su extremo 5' terminal la secuencia del promotor de la T7 de la *RNA polimerasa*, en adición a un conjunto de nucleótidos que son complementarios a la secuencia del RNA blanco. Seguido este paso, la *AMV-RT* elonga al primer, creando un DNAc (el cual es una copia del RNA blanco) y formando así un híbrido RNA/DNA. La *RNasa H* reconoce a este híbrido como sustrato e hidroliza a la porción del RNA del híbrido, dejando un DNA de cadena sencilla, al cual el segundo oligonucleótido se alinea. La *AMV RT* elonga al segundo oligo, produciendo así la porción del promotor de T7 de DNA de doble cadena y haciéndolo transcripcionalmente activo. La *T7 RNA polimerasa* reconociendo al nuevo promotor funcional, produce múltiples copias de transcritos de RNA que son anti-sentido a la secuencia blanco del RNA original. En la reacción también hay una sonda molecular la cual se une directamente con cada uno de los transcritos producidos siempre y cuando sean complementarios a ésta.

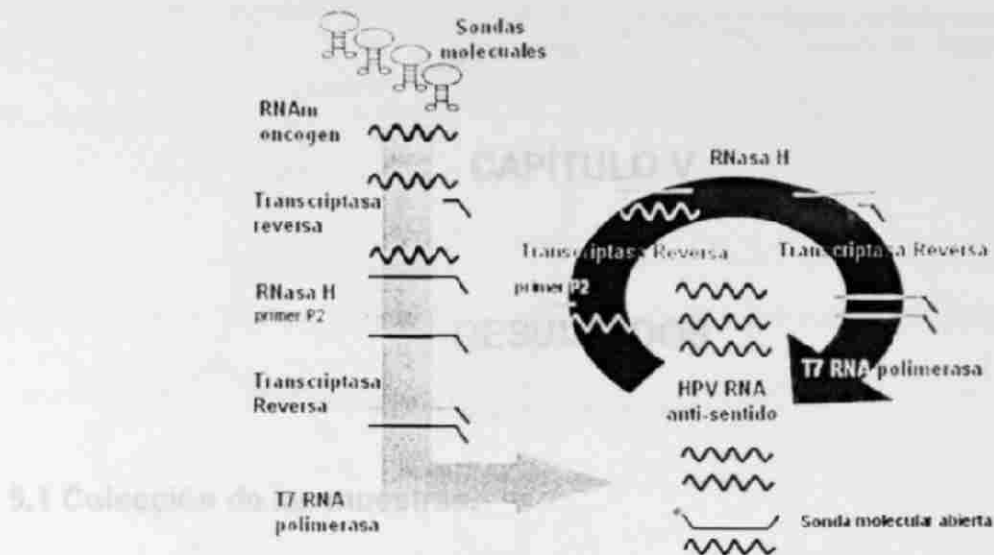


Figura 10. Representación esquemática de la reacción de Nasba. La figura muestra los diferentes pasos y elementos empleados en esta reacción.

La detección se llevó a cabo mediante una máquina conocida como PCR de tiempo real, la cual es un termociclador pero en su parte superior tiene un sistema óptico que permite detectar las sondas moleculares. Esta es muy sensible y confiable, cuantificando la generación de los amplicones conforme se van generando (por ello se le refiere como de tiempo real). Todos los reactivos para la amplificación con Nasba fueron obtenidos del estuche comercial Pre Tec HPV-profear (Norchip). Las instrucciones del estuche fueron seguidas al pie de la letra. Inicialmente el estuche fue probado con controles positivos y negativos (RNA de líneas celulares VPH positivas como HeLa, CaSki, SiHa y 9E como controles positivos, así como las líneas celulares COS y 3T3, como controles negativos). Solo 5 µl del RNA de cada muestra fueron utilizados. La detección y cuantificación de los transcritos fue analizada con el programa Pre Tect Data Analyser de Norchip.

CAPÍTULO V

RESULTADOS

5.1 Colección de las muestras.

Los centros de salud pertenecientes de la Secretaría de Salud Estatal que participaron en este estudio fueron divididos en cuatro jurisdicciones, tres de las cuales fueron fuentes de muestras para este estudio. Un total de 1282 cepillos cervicales en medio de preservación fueron colectados en el periodo de julio y agosto del 2002, junto con sus respectivos cuestionarios, laminillas citológicas y hojas de consentimiento informado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La jurisdicción I abarcó desde Santa Catarina hasta San Nicolás incluyendo parte del centro y de la Colonia Cumbres, contribuyendo con 23.48% de las muestras. La jurisdicción II participó con un 14.12% de las muestras y abarcó desde la calle Guerrero hacia el oriente, contemplado todo el municipio de Escobedo. La jurisdicción III, la cual comprendió desde Villas de Garcia, hasta Santa Catarina parte sur y San Pedro, participó con un 62.40 % de las muestras. La figura 11 muestra geográficamente las colonias que abarcaron cada región y por lo tanto el área representativa de las muestras.

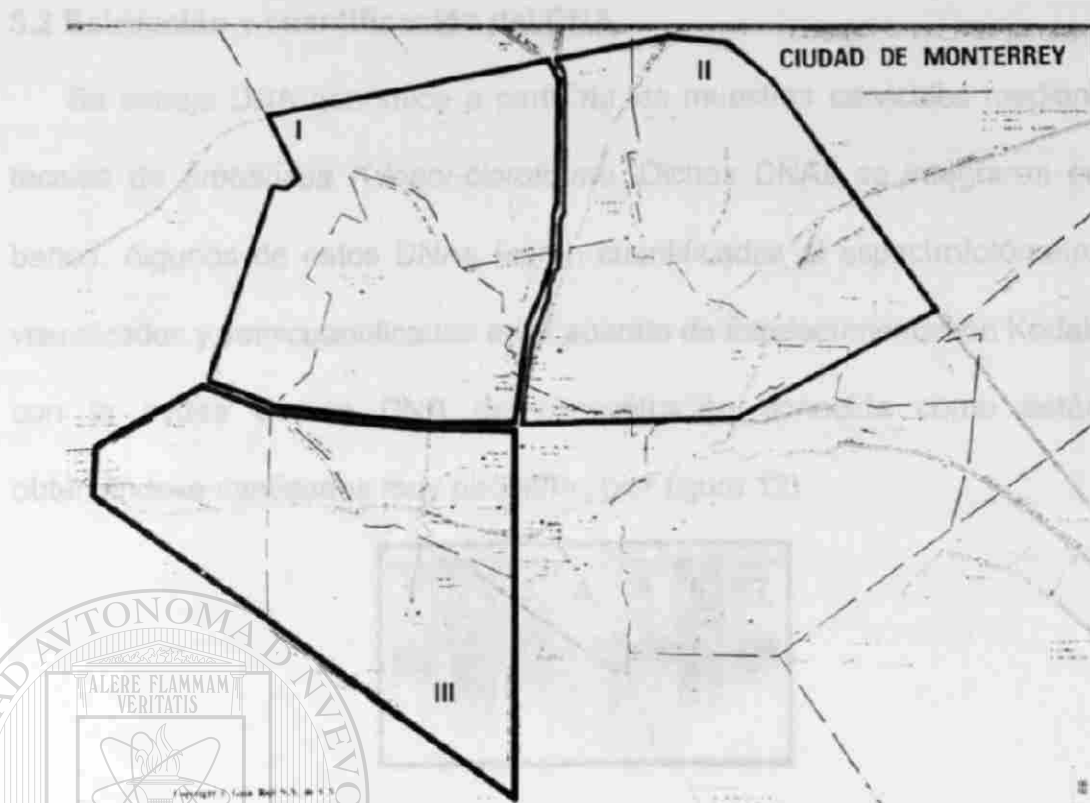


Figura 11. Mapa de la ciudad de Monterrey mostrando el área geográfica dentro de la cual las muestras fueron tomadas. Los números en negro indican el número de la jurisdicción, mientras que las líneas gruesas el límite entre cada jurisdicción.

La edad de las pacientes así como algunos antecedentes gineco-obstétricos de cada una de ellas, se analizaron y se muestran en la tabla 3. La prevalencia de los hallazgos citológicos anormales fue de 8/800 (1%), todas ellas mostraron NIC I.

Tabla 3. Características de la población estudiada.

Parámetro	Rango	Media
Edad (años)	15-67	33.94
EPE (años)	12-39	19.62
Gestas	0-12	4.16
Paridad	0-12	3.12
EPM (años)	8-19	12.65
NCS	0-4	1.22

EPE=Edad del primer embarazo, EPM=edad de la primera menstruación, NCS=número de compañeros sexuales.

5.2 Extracción y cuantificación del DNA.

Se extrajo DNA genómico a partir de las muestras cervicales mediante la técnica de *proteínasa K-fenol-cloroformo*. Dichos DNAs se integraron en un banco. Algunos de estos DNAs fueron cuantificados al espectrofotómetro y/o visualizados y semicuantificados en el aparato de fotodocumentación Kodak 1D, con la ayuda de un DNA de concentración conocida como estándar, obteniéndose cantidades muy pequeñas (ver figura 12).

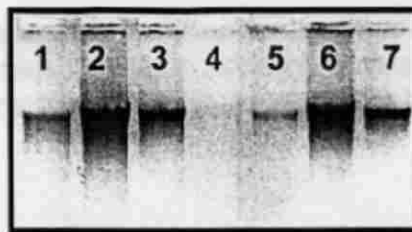


Figura 12. DNA genómico resuelto en gel de agarosa al 0.8%. Los carriles 1 al 7 muestran DNAs que corresponden a diferentes pacientes.

5.3 Verificación de la calidad del DNA.

5.3.1 Amplificación y detección del gen β -actina. Se procedió a verificar la calidad de la extracción del DNA mediante la amplificación del gen casero β -actina, para lo cual las 1282 muestras fueron amplificadas y resueltas en geles de agarosa. Una banda de aproximadamente 240 pb reveló la presencia del amplicón de este gen. De las 1282 muestras, un total de 1200 muestras amplificaron, mientras que las 82 restantes no mostraron amplificación alguna (ver figura 13).

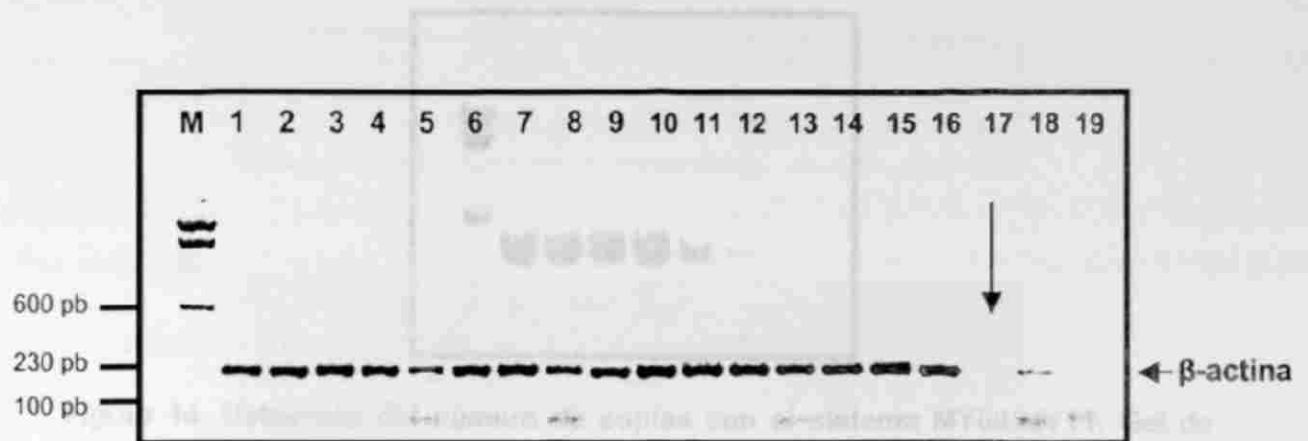


Figura 13. Gel de agarosa al 2% mostrando la amplificación del gen β -actina. Los carriles del 1 al 19 corresponden a muestras de diferentes pacientes. Las muestras 18 y 19 mostraron una amplificación muy débil, mientras que la 17 no amplificó.

5.4 Detección del virus del papiloma humano.

5.4.1 Detección del número de copias. El DNA de las líneas celulares

CaSkí y SiHa (controles VPH 16 positivos con 500 y 1 copia, respectivamente)

fueron utilizados para verificar la sensibilidad de esta reacción. Se utilizaron diluciones seriadas a partir de 40ng/ μ l hasta 0.004 fg/ μ l para amplificar el VPH

con ambos sistemas. Con el sistema MY09-MY11 la sensibilidad fue de 333 copias en SiHa, mientras que con el sistema LCR-E7 se pudieron detectar 535 copias (ver figura 14).

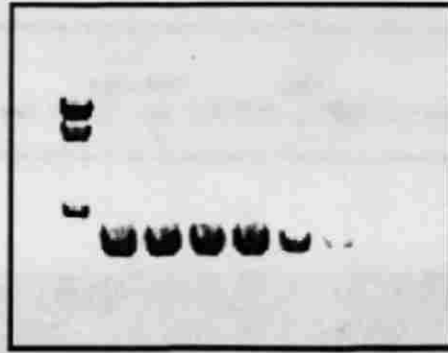


Figura 14. Detección del número de copias con el sistema MY09/MY11. Gel de agarosa al 2% mostrando los amplicones de las diferentes diluciones utilizadas.

5.4.2 Detección y tipificación de los VPHs. La figura 15 muestra el proceso de detección y tipificación de VPH. La tabla 4 presenta la prevalencia de la detección del VPH. Se detectó la presencia del VPH en 305/1200 (25%) de las muestras. Dosecientos cincuenta y ocho mujeres fueron infectadas con un

tipo simple de VPH y cuarenta y cinco con múltiples tipos. Treinta y ocho diferentes tipos de VPHs fueron detectados, siendo el tipo más común el VPH 16, seguido del VPH 31 (ver tabla 4). Se detectaron 258 infecciones sencillas, 35 con infecciones dobles, 10 triples y 2 cuádruples. La mayoría de las infecciones sencillas (84%) y las infecciones múltiples (15%) involucraron uno o más de un tipo de alto riesgo. Fueron identificados 16 tipos de alto riesgo, 6 de bajo riesgo y 16 tipos no clasificados.

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

Tabla 4. Prevalencia de los tipos detectados en la población del área metropolitana de Monterrey, NL.

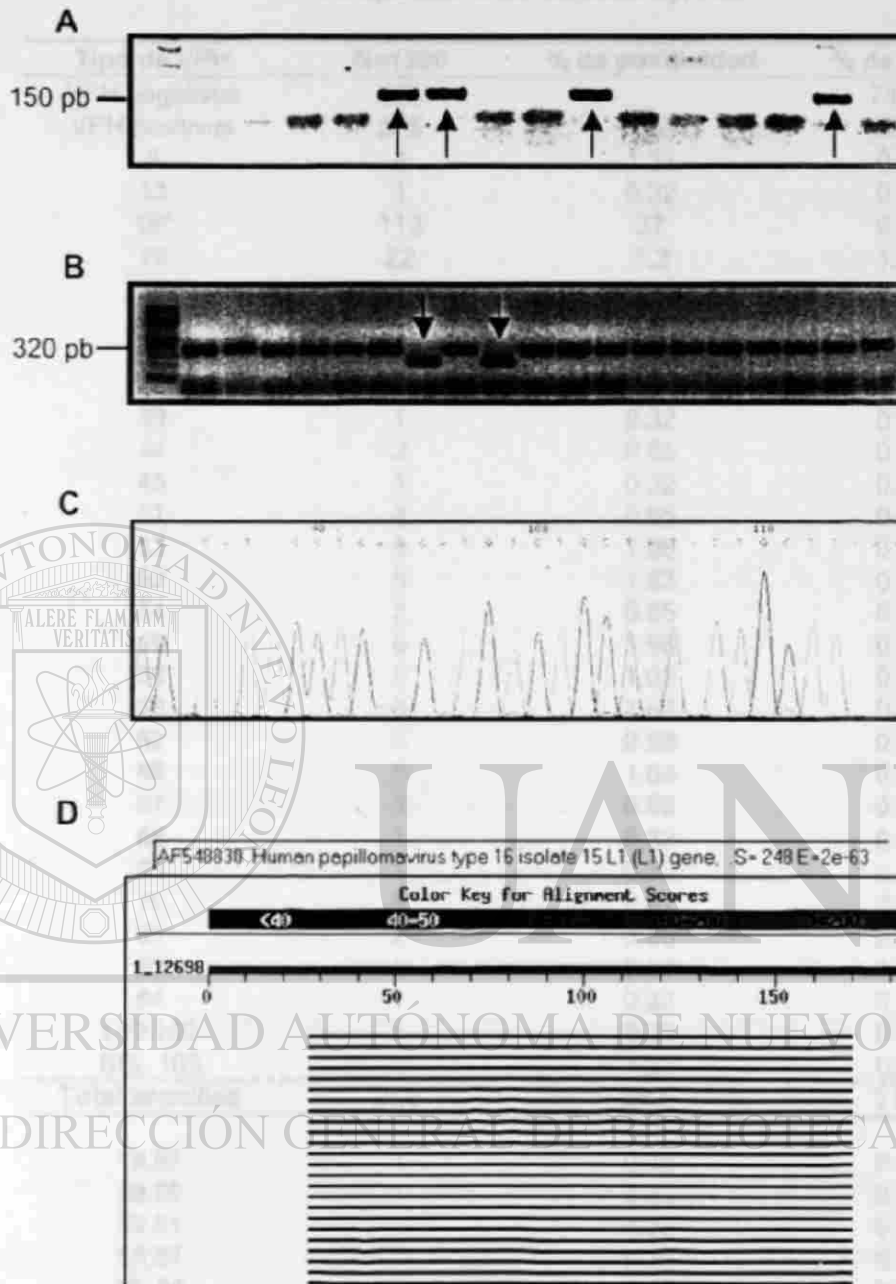


Figura 15. Proceso de detección y tipificación de los VPHs. Se muestra: A) La detección de los VPHs con el sistema anidado MY09/MY11-Gp5+/Gp6+ (las flechas indican las muestras positivas). B) Gel de agarosa al 2%, mostrando las colonias positivas después de clonar el producto de PCR (las flechas indican las colonias sin el inserto). C) Cromatograma mostrando la secuencia de una de las muestras VPH positivas. D) Determinación del tipo de VPH mediante la ayuda del programa BLAST.

Tabla 4. Prevalencia de los tipos detectados en la población del área metropolitana de Monterrey, N.L.

Tipo de VPH	N=1200	% de positividad	% de todos
VPH negativos	895		74.58
VPH positivos	305	100	25.41
6	4	1.31	0.33
13	1	0.32	0.08
16*	113	37	9.40
18	22	7.2	1.82
31	39	12.8	3.25
32	1	0.32	0.08
33	4	1.31	0.33
35	9	2.95	0.75
39	1	0.32	0.08
44	2	0.65	0.16
45	1	0.32	0.08
51	2	0.65	0.16
52	6	1.96	0.50
53	5	1.63	0.41
54	2	0.65	0.16
56	6	1.96	0.50
58	5	1.63	0.41
59	5	1.63	0.41
62	3	0.98	0.25
66	5	1.63	0.41
67	3	0.98	0.25
68	1	0.32	0.08
69	1	0.32	0.08
70	8	2.62	0.66
81	2	0.65	0.16
83	1	0.32	0.08
84	1	0.32	0.08
LVX100	1	0.32	0.08
SDI 105	4	1.31	0.33
Total sencillas	258	84.6	21.5
16,67	1	0.32	0.08
59,68	1	0.32	0.08
59,81	1	0.32	0.08
16,87	1	0.32	0.08
16, 31	3	0.98	0.25
16, 68	1	0.32	0.08
16, cp6108	1	0.32	0.08
16, 58	1	0.32	0.08
58, 67	1	0.32	0.08
16, DL416	1	0.32	0.08
18, 51	2	0.65	0.16
6, 16	1	0.32	0.08
16, PN**	1	0.32	0.08
16, 18	1	0.32	0.08
53, 30	1	0.32	0.08
16, 35	1	0.32	0.08
16, 56	1	0.32	0.08
67, 68	1	0.32	0.08

®

58, 56	1	0.32	0.08
51, 58	1	0.32	0.08
31, 54	1	0.32	0.08
51, 82	1	0.32	0.08
31, 18	1	0.32	0.08
39, 68	1	0.32	0.08
18, 84	1	0.32	0.08
34, 18	1	0.32	0.08
56, 18	2	0.65	0.16
18, 52	1	0.32	0.08
18, 67	1	0.32	0.08
18, 53	1	0.32	0.08
16, 69	1	0.32	0.08
67, 18, 16	1	0.32	0.08
18, 58, 16	1	0.32	0.08
16, 31, 53	1	0.32	0.08
56, 70, LVX160	1	0.32	0.08
16, 35, 51	1	0.32	0.08
31, 53, 52	1	0.32	0.08
44, 53, 74	1	0.32	0.08
31, 70, LVX160	1	0.32	0.08
58, 11, 51	2	0.65	0.16
52, 53, 45, 67	1	0.32	0.08
6, 18, 81, 68	1	0.32	0.08
Total múltiples	47	15.40	3.91
total	1700		100

*Tipos de alto riesgo en negritas.

**PN=Posible nuevo VPH

5.5 Detección de las variantes moleculares de los VPHs 16, 18, 31 y 35.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

5.5.1 Diseño de oligonucleótidos y estandarización. Se diseñaron dos pares de oligonucleótidos mediante la ayuda del programa *Primer Select*, los cuales corresponden a un segmento importante de la LCR del VPH-31 y VPH-35. En el caso del VPH-31, un segmento de 523 pb comprendido entre las posiciones genómicas 7527-137 fue el amplificado, mientras que para el VPH-35 el segmento en cuestión fue de 893 pb, entre las posiciones 7146-187.

Se procedió a estandarizar las diferentes reacciones de amplificación para cada LCR con cada juego de oligonucleótidos, variando las concentraciones de *Taq* DNA polimerasa, oligonucleótidos, $MgCl_2$ y dNTPs. Finalmente, se estandarizaron reacciones que en general contenían: 2 μ l de DNA, 1 pM de oligonucleótidos y 1 U de *Taq* polimerasa en un volumen final de 25 μ l. Las muestras VPH 16 fueron analizadas utilizando los oligos reportados por Ho y cols.,¹³² los cuales fueron estandarizados usando la enzima *Go Taq polimerasa* (ver figura 16). El mínimo número de copias detectado para cada juego de oligonucleótidos fue determinado, evidenciándose que todos los juegos de iniciadores pudieron detectar un mínimo número de copias en una rango de 13 a 9.

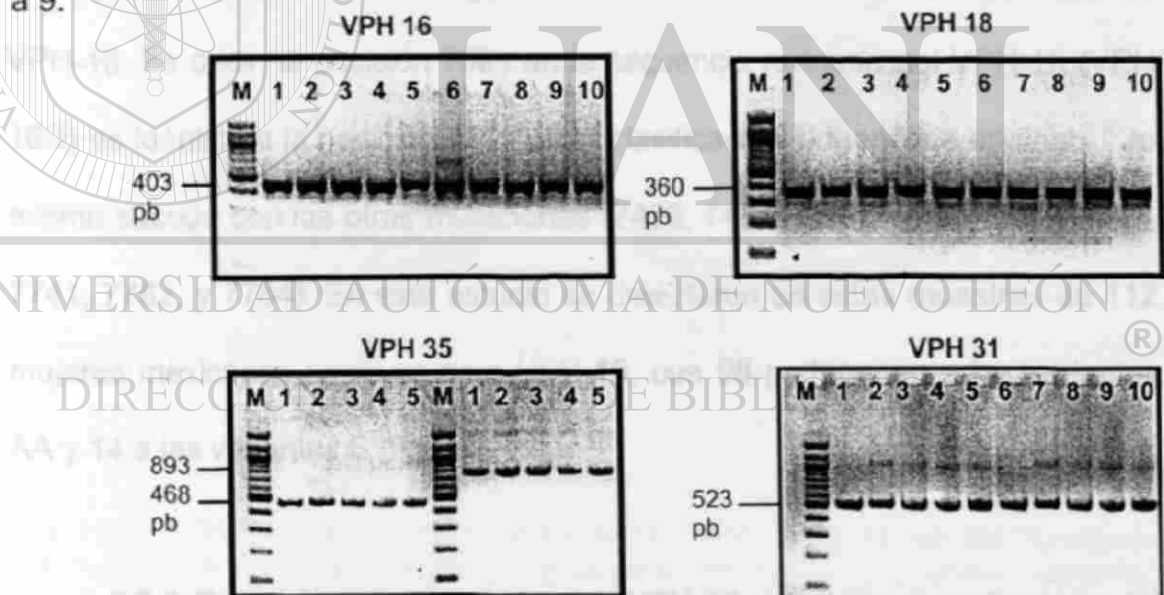


Figura 16. Geles de agarosa mostrando la amplificación de las variantes moleculares del VPH 16, 18, 31, 35. Se muestra: A) La amplificación del VPH16, B) La amplificación del VPH 18, C) La amplificación de las variantes del VPH 35, y D) La amplificación del VPH 31.

5.5.2 Detección de las variantes moleculares del VPH-16. Todas las muestras VPH-16 investigadas resultaron pertenecer a cualquiera de las seis variantes en un segmento de 320 pb.

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

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

Tabla 5. Variantes moleculares del VPH 18

	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	
	4	4	4	5	5	5	5	5	5	6	6	5	5	6	6	6	
	6	8	9	1	2	3	3	6	6	9	4	5	5	7	0	2	3
	9	6	6	2	9	0	1	3	7	2	3	1	8	0	4	6	0
Referencia	T	C	C	G	C	T	T	G	A	T	T	T	A	A	T	C	C
MX854			G	A		C		A	C	C	G	C	C	T	C	T	A
MX978					A		G		C	C				T			
MX690	G				A				C	C				T			
MX1035			G	A		C		A	C	C	G	C	C	T	C	T	
MX87					A				C	C				T			
MX887		T			A				C	C				T			
MX1249					A		G		C	C				T			
MX1234		T			A				C	C				T			
																	Variante
																	Af1
																	E
																	E
																	Af1
																	E
																	E
																	E
																	E

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

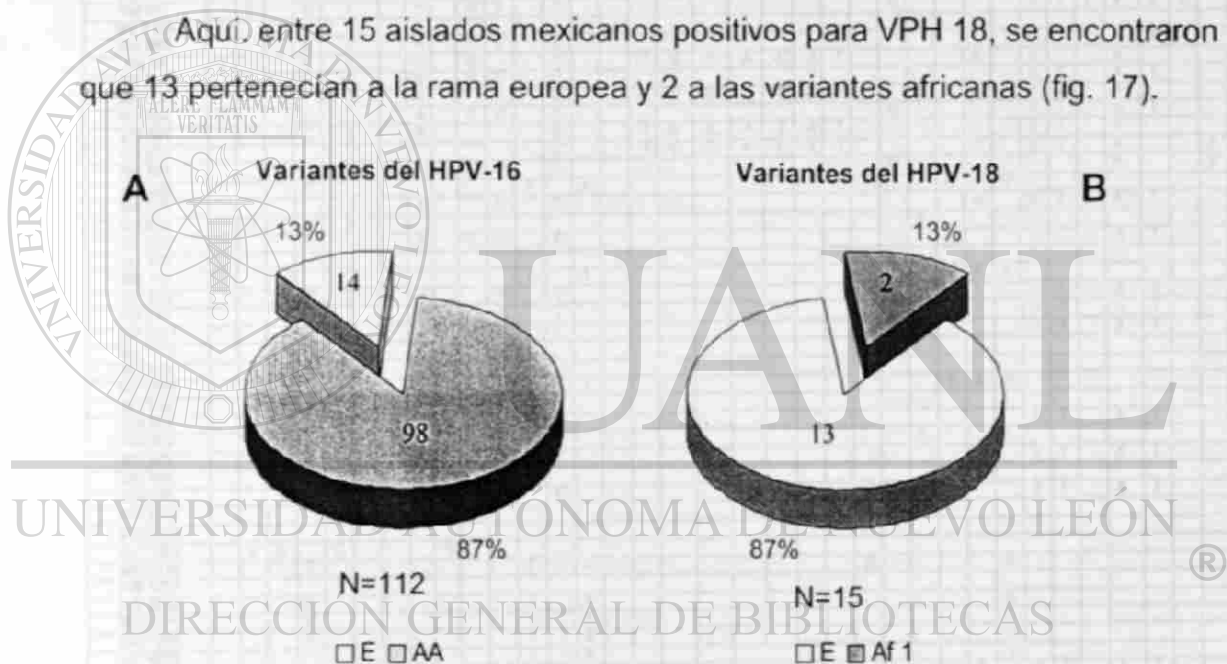


Figura 17. Prevalencia de las variantes del VPH 16 y 18 en las muestras mexicanas. De entre las muestras positivas para VPH 16 (A), se detectaron variantes E (13%) y AA (87%), mientras que de entre las muestras positivas para VPH 18 (B), se observaron variantes E (87%) y Af1 (13%).

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

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

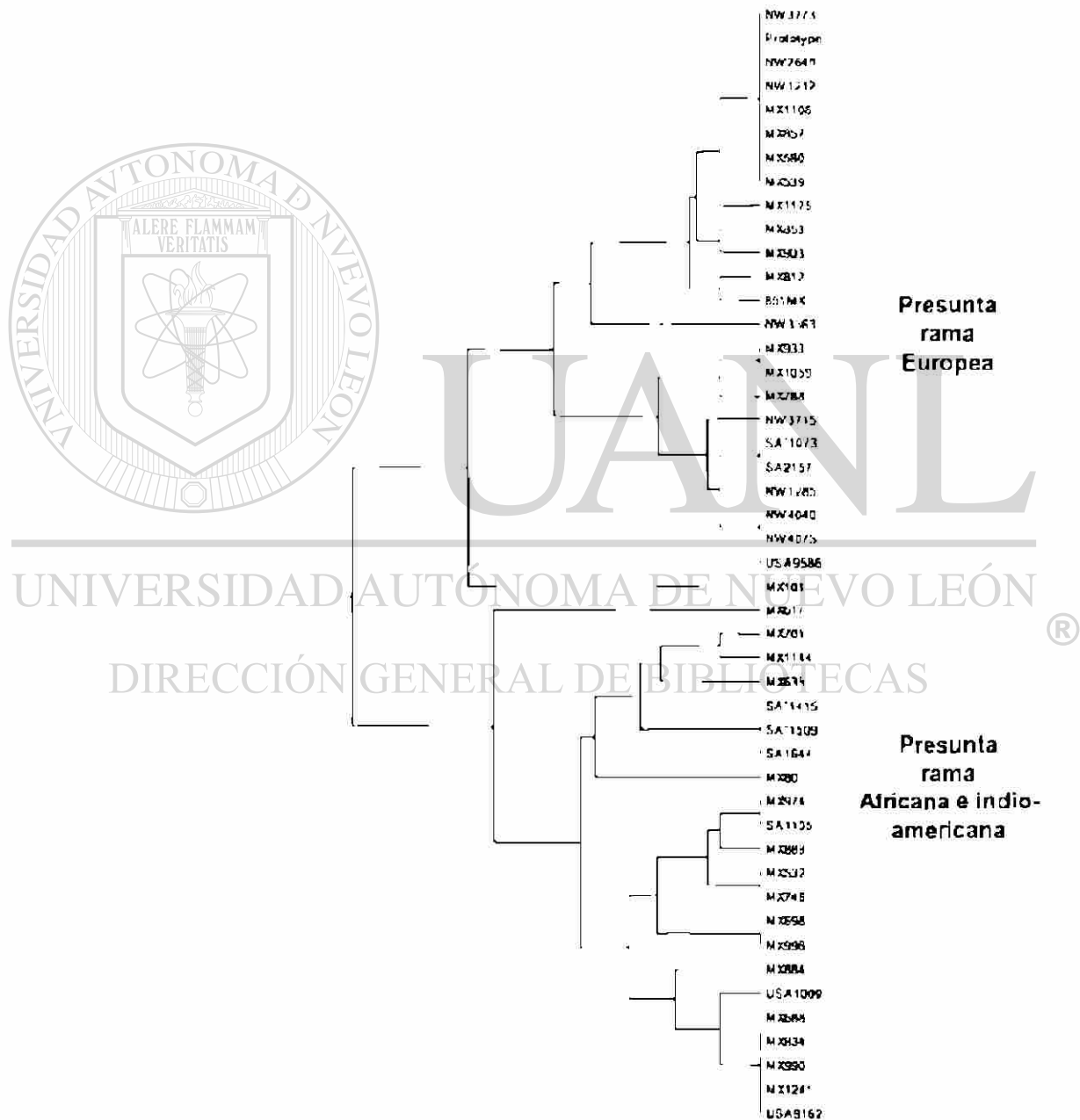


Figura 19. Árbol filogenético de las variantes del VPH 31 de México, Noruega, Sudáfrica y los EUA. La nomenclatura es como se describe en la leyenda de la figura 18.

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

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

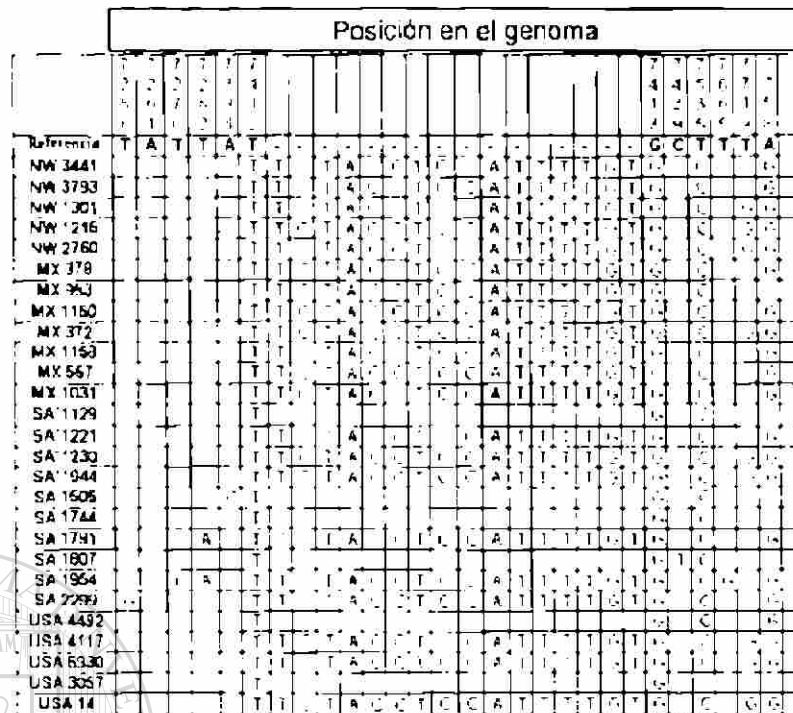


Figura 20. Variación genómica de los aislados VPH-35. La figura muestra las diferentes mutaciones detectadas en un segmento genómico de 893 pb, región que corresponde a la mitad del extremo 3' de la LCR viral. En la parte superior se observa la posición genómica en donde las mutaciones fueron detectadas.

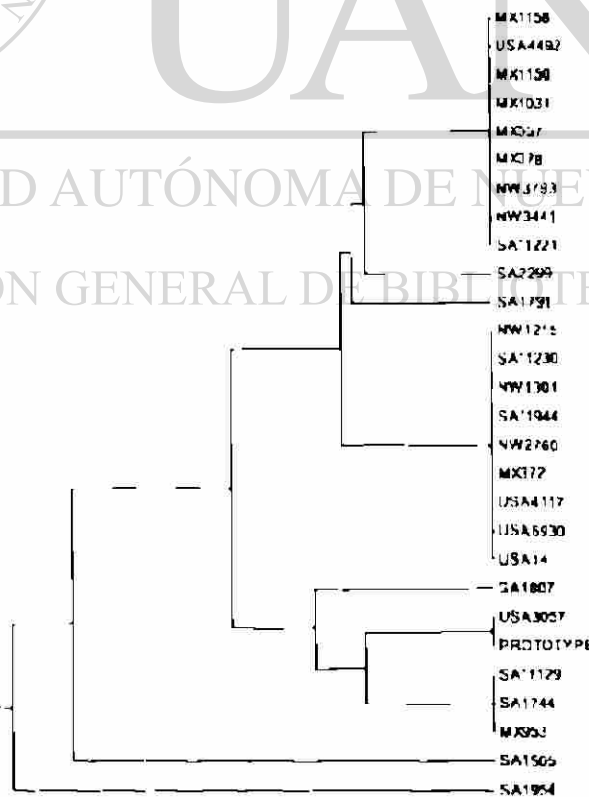


Figura 21. Árbol filogenético de las variantes del VPH-35 de México, Noruega, Sudáfrica y los EUA. La nomenclatura es como se describe en la leyenda de la figura 18.

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

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

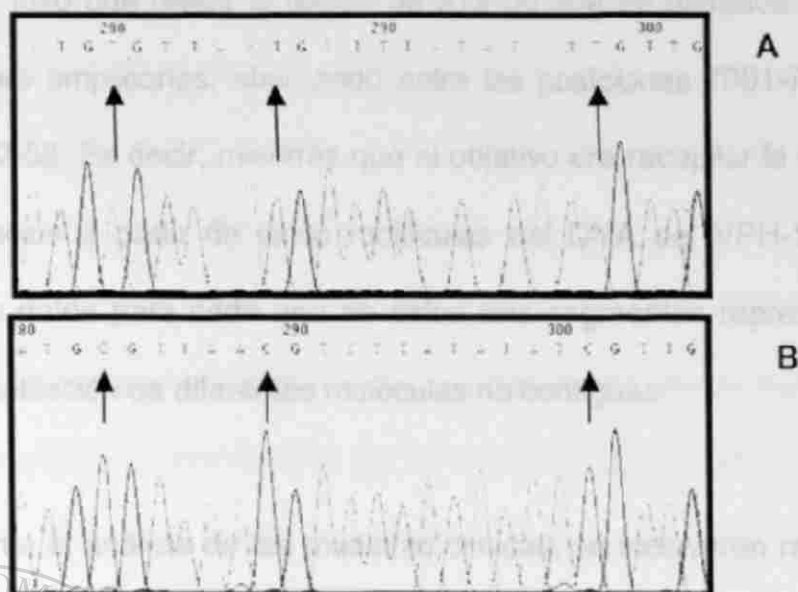


Figura 22. Cromatogramas mostrando CpGs metilados y no metilados. A) Secuencia no metilada. Las flechas muestran a las citosinas convertidas en timinas debido a que no estaban metiladas; B) Secuencia metilada. Las flechas indican a las citosinas metiladas.

Se decidió estandarizar el análisis amplificando y secuenciando un segmento genómico entre las posiciones 7079 y 85, que incluyen 19 CpGs.

Tres de estos 19 CpGs fueron derivados del extremo 3' del gen L1 (7091, 7136, y 7145), cinco del segmento 5' de la LCR (7270 a 7461, la cual hace contribuciones aún sin entender al proceso transcripcional), seis del potenciador transcripcional (7535 a 7862) y cinco del promotor de E6 (31-58). Se seleccionó este segmento con el fin de detectar posibles correlaciones de los blancos de la metilación con las unidades funcionales conocidas del genoma del VPH-16.

Es bien sabido que la modificación con bisulfito no solamente altera los residuos de citosina, sino que introduce rupturas en el DNA. Por consiguiente, es imposible amplificar mediante PCR con eficiencia alta regiones de DNA de tamaños que excedan algunos cientos de pares de bases. Debido a esta

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

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

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

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

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

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

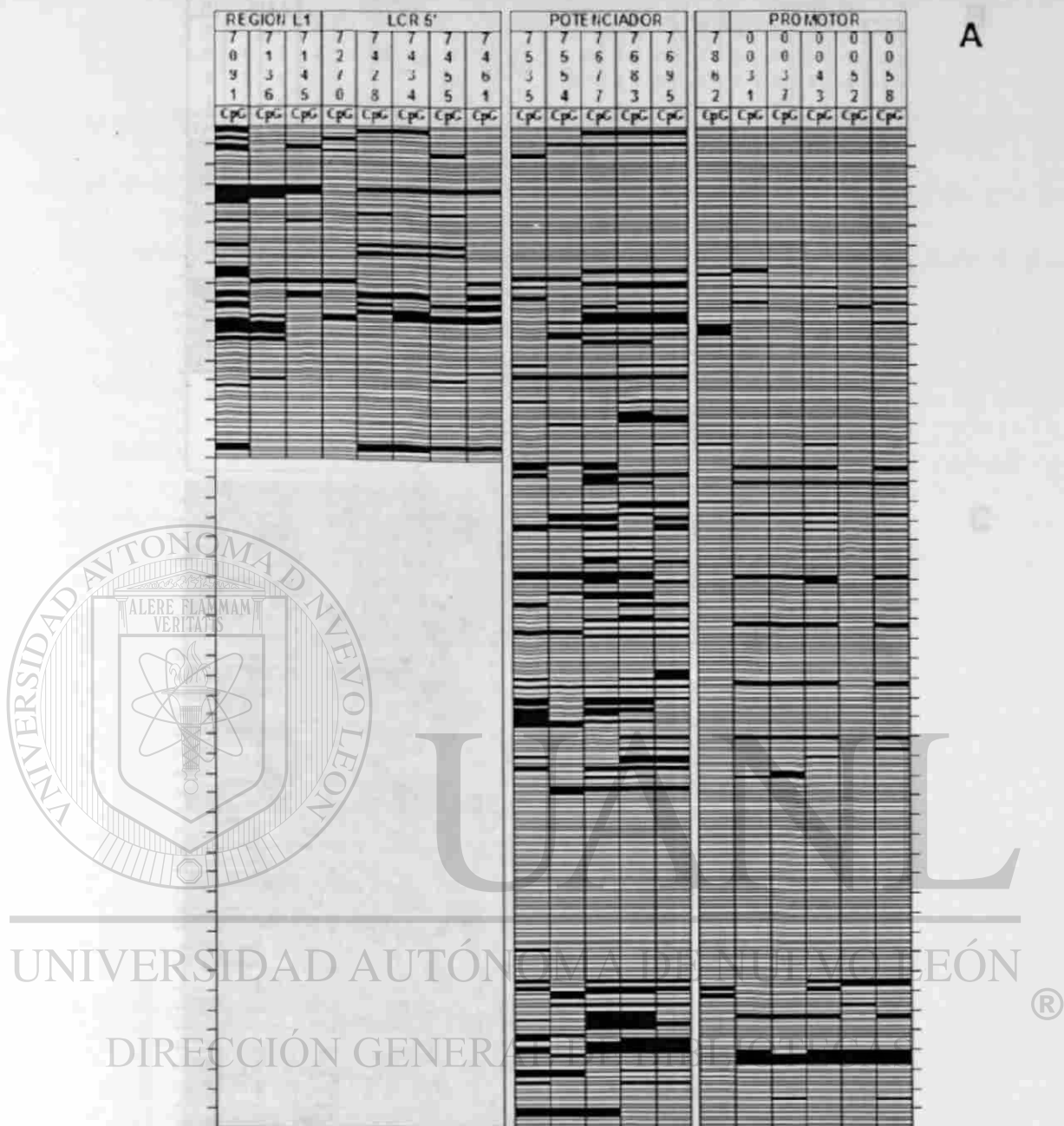


Figura 24. Heterogeneidad de la metilación de los CpG en los genomas del VPH-16 derivados de especímenes clínicos. La figura muestra la metilación de los 19 dinucleótidos CpGs en los genomas del VPH-16 de cinco clones independientes derivados de cada una de las 115 muestras clínicas, una base de datos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

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

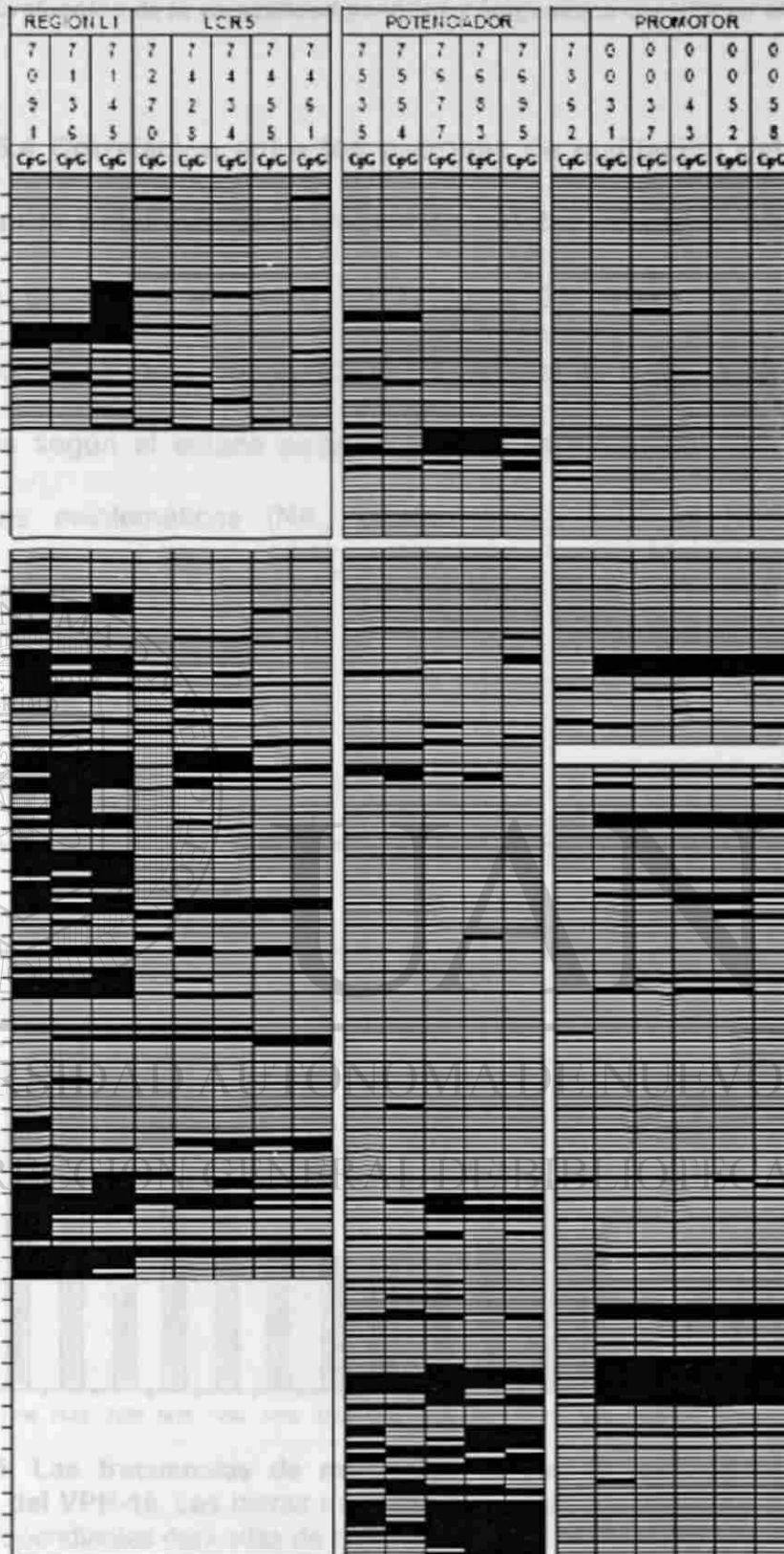


Figura 24. Heterogeneidad de la metilación de los CpG en los genomas del VPH-16 derivados de especímenes clínicos. La cohorte mexicana tenía un 70% de las variantes genómicas AA y solo el 30% de las variantes E, mientras que todas la muestras noruegas y de los EUA eran variantes E. No se pudo detectar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

Para los nucleótidos con menor metilación, la proporción que mostró metilación

5.6.4 Correlación entre los patrones de metilación del DNA de los CpGs fue del 4% en la posición 7062 y estuvo en un rango entre el 12% y el 53% para el resto de los sitios CpG (veremos adelante). La proporción de todas las barras mostrado en la figura 25 refleja los resultados del diagnóstico de la metilación en los sitios CpG, el de la figura 26 separa estos para los sitios CpG localizados en 7062, 7475 y 7695, cuando se prueba de 1 resultados según el estado patológico de la infección del VPH-16, es decir infecciones asintomáticas (NIL, barras rosas), lesiones NICs (verdes) y cuando entre 2 y el 4% de los experimentos asintomáticos, y los experimentos carcinomas (morados).

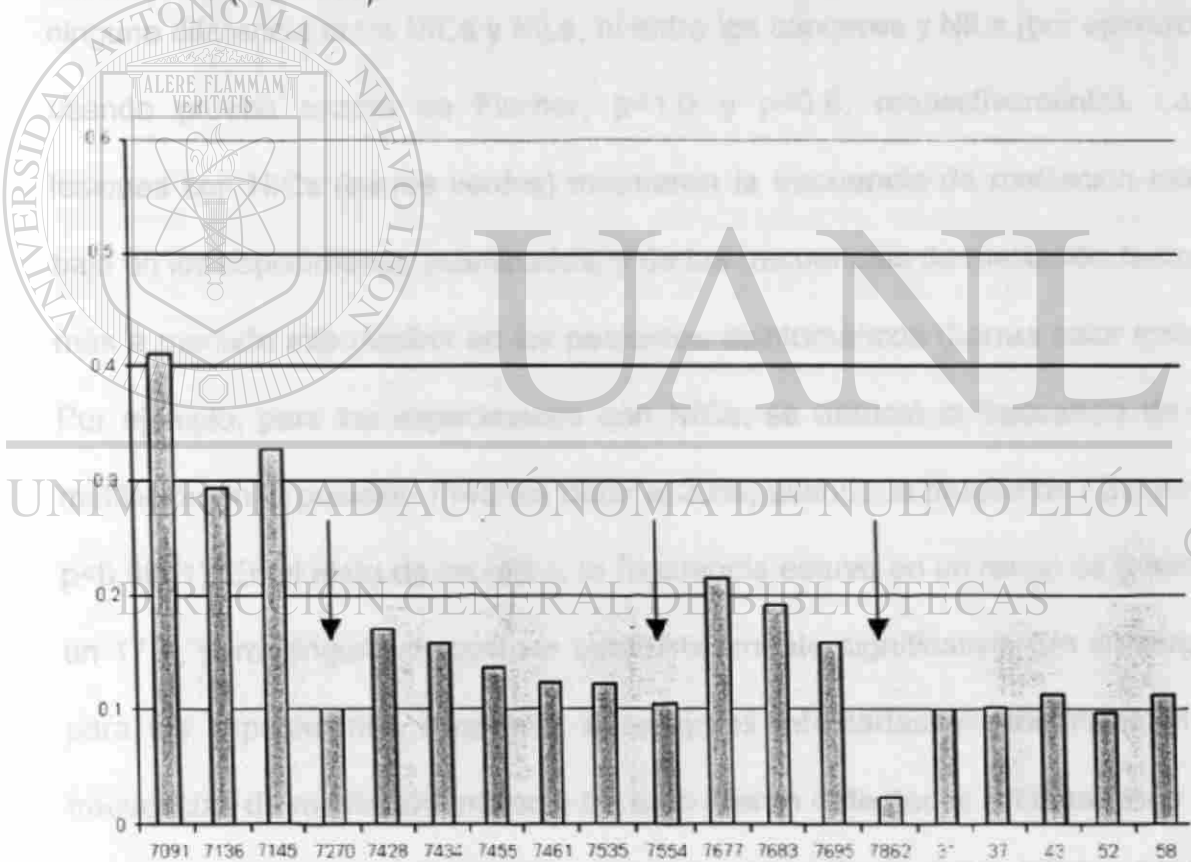


Figura 25. Las frecuencias de metilación de los 19 nucleótidos CpG en los genomas del VPH-16. Las barras muestran los resultados obtenidos a partir de las 5 clonas independientes derivadas de cada una de las 115 muestras clínicas. Las flechas indican los tres sitios en donde se detectó menor metilación.

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

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

contra el 7%, p -para cada comparación: $p=0.0004$, para 37 el 17% contra el

7%, $p=0.0002$

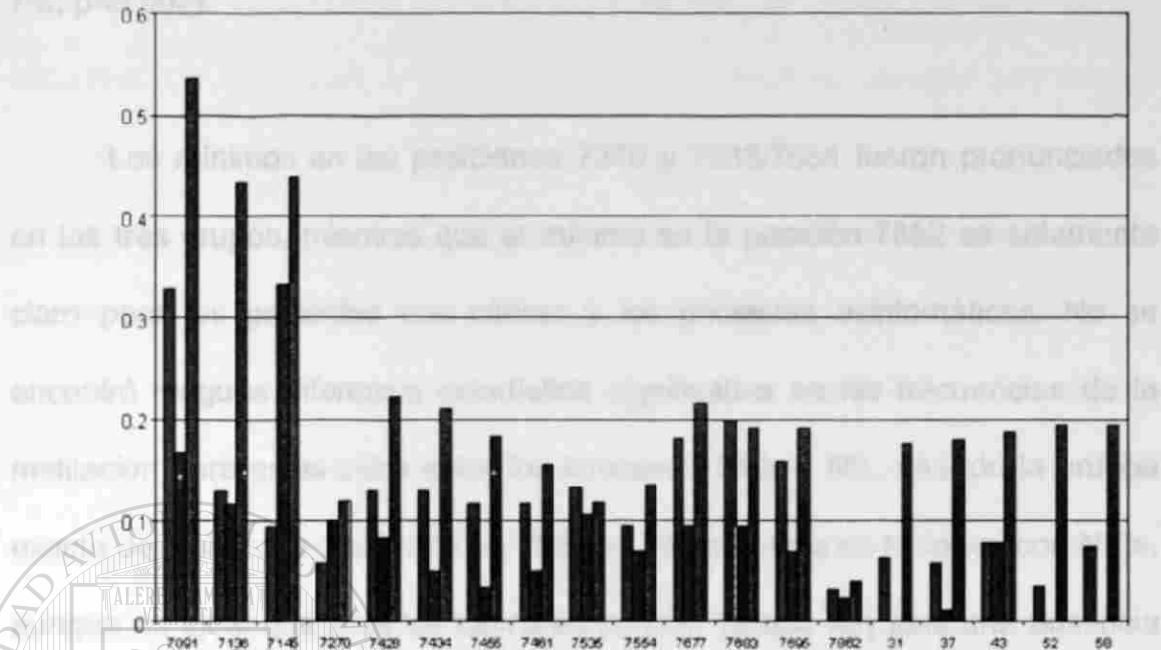


Figura 26. Las frecuencias de metilación de los 19 dinucleótidos CpGs en los genomas del VPH-16 de cinco clonas independientes derivadas de las 115 muestras clínicas separadas por patología. Las barras color rosa muestran a los pacientes asintomáticos (NIL); las barras verdes a NICs de alto y bajo grado;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

Para los cánceres, el 42% de especímenes mostraron metilación en los

sitios CpG 7136 y 7145. En comparación, sólo el 13% y el 9% de sitios en 7136

y 7145 estuvieron metilados en especímenes de mujeres infectadas

asintomáticamente (es decir, para cada comparación, se usó la prueba exacta

de Fisher, $p < 0.00002$). Además, en el sitio 7145, el 33% de especímenes con

NICs mostraron metilación en comparación con el 9% de los especímenes de

las mujeres con NIL (de manera similar, $p = 0.0005$). Finalmente, cuando se

compararon los especímenes de mujeres con NIL, la metilación en muestras

con cáncer fue significativamente elevada en las posiciones 31, 37, 52 y 58

(usando la prueba exacta de Fisher, para 31: el 17% contra el 6%, $p < 0.0004$;

para 37: el 17% contra el 6%; para 52: el 18% contra el 4%; y para 58: el 18%

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

mantenimiento de la metilación han sido demostrado recientemente.^{141,142,143}

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

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

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

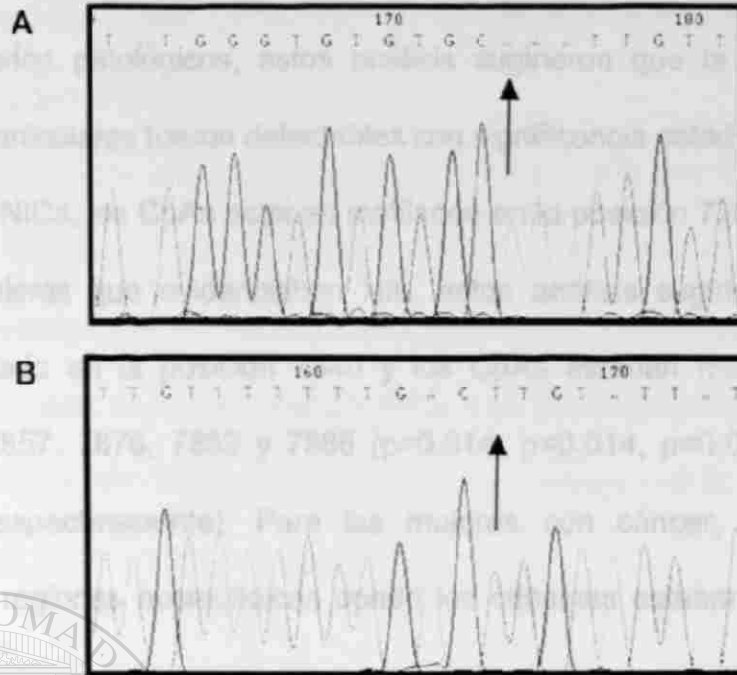


Figura 27. Cromatogramas mostrando la metilación en los dinucleótidos CpAs y CpTs. La figura muestra: A) La citosina metilada seguida de una adenina, lo que indica metilación en el dinucleótido CpA y B) metilación en CpT.

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

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

CpA y CpT

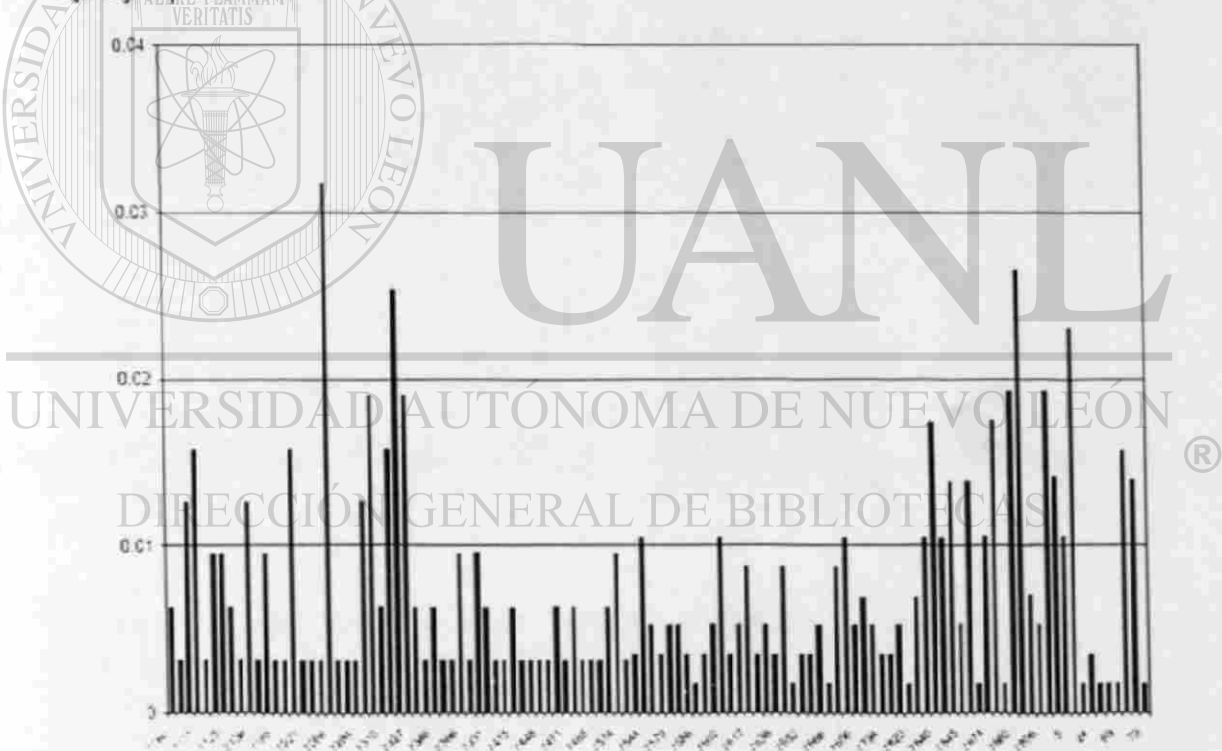


Figura 28. Metilación de las CpAs y CpTs en las 115 muestras analizadas. El diagrama muestra las posiciones y el porcentaje de metilación de los CpAs y CpTs detectados en este estudio.

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

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

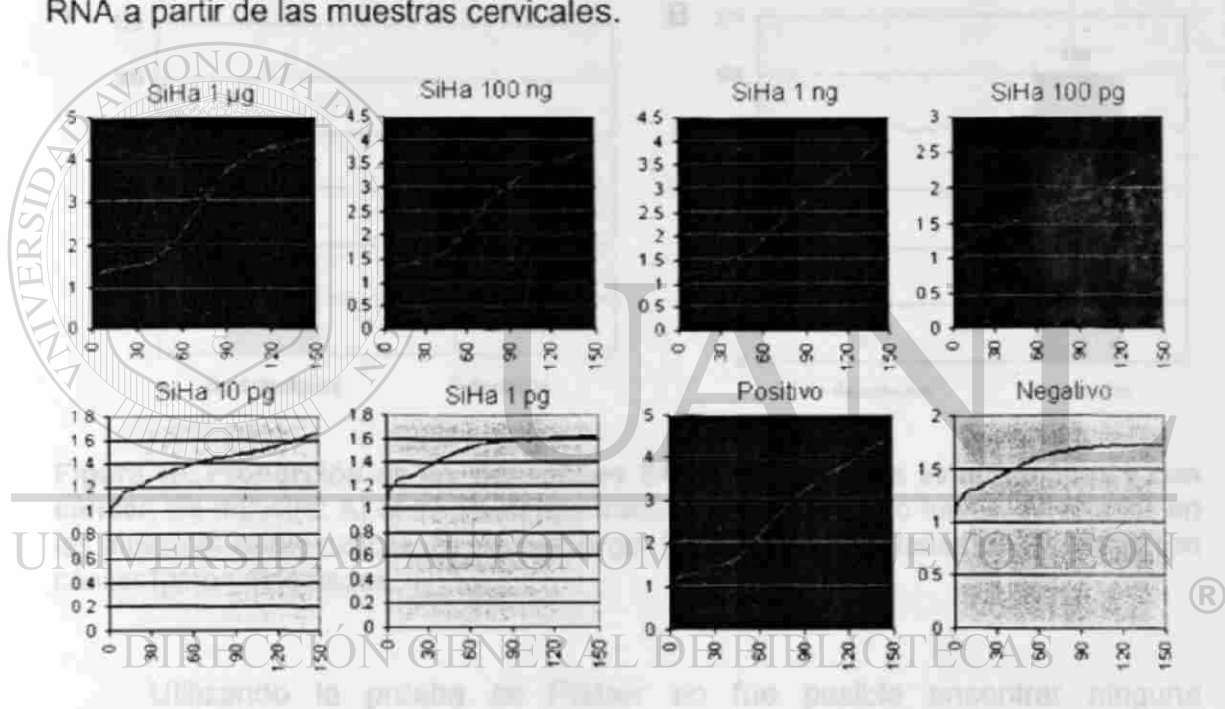


Figura 29. Amplificación de VPH 16 usando NASBA en la línea celular SiHa. Las gráficas muestran las diferentes diluciones de SiHa (1 µg hasta 1 pg), así como a los controles positivo y negativo. Los cuadros en verde muestran las muestras positivas para la detección. El eje de las X muestra el tiempo de la reacción y el eje de las Y las unidades relativas de fluorescencia.

Solo 16 muestras (8 muestras asintomáticas y 8 muestras con cáncer) fueron utilizadas para investigar la presencia de los transcritos E6/E7. La extracción del RNA fue llevada a cabo mediante la técnica conocida como

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

Tabla 9. Resultados del análisis con NASBA en las muestras estudiadas.

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

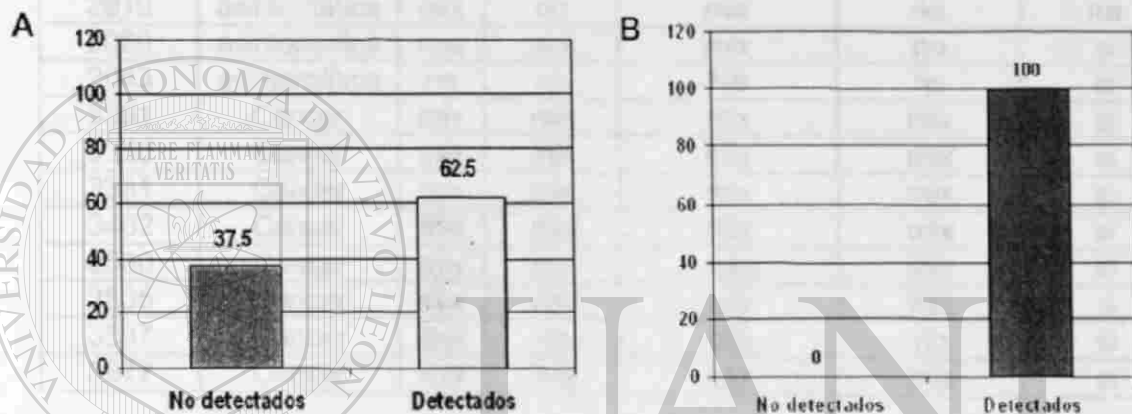


Figura 30. Proporción de los transcritos E6/E7 en muestras asintomáticas y con cáncer. Se muestra: A) el 37.5% de los transcritos de E6/E7 no fueron detectados en las muestras asintomáticas, B) Sin embargo, los transcritos de todas las muestras con cáncer fueron detectados.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

*NA= no analizado por falta de DNA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN

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

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

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

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

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

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

los componentes del comportamiento explicarían esta disparidad, o si las variantes AA del VPH-16 se distribuyen más eficientemente que las variantes E.

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

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

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

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

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

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

Europa y África.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

No se detectó un solo segmento genómico del VPHV-16 que estuviera completamente metilado o al menos en un grado de hipometilación. En un estudio previo,¹²⁵ encontraron que de 15 muestras clínicas 5 parecían estar completamente metiladas en el segmento potenciador-promotor. Creemos que estos datos actuales son más representativos del destino típico de los genomas del VPH-16, ya que los descubrimientos anteriores fueron basados en un segmento genómico mucho más corto y con la técnica de secuenciación directa, la cual pudo haber registrado como completamente metilados mezclas de DNAs del VPH-16 que estaban metilados o no metilados en la misma posición.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

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

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

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

CAPITULO VII

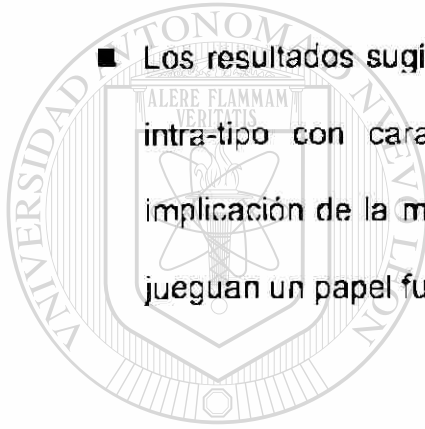
CONCLUSIONES

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

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPÍTULO VIII

BIBLIOGRAFÍA

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

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

38. Orth G, Favre M & Croissant O. Characterization of a new type of human papillomavirus that causes skin warts. *J. Virol.* 1977;24:108-120.
39. Gissmann L & zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (condylomata acuminata). *Int. J. Cancer* 1980;25:605-609.
40. Gissmann L, Diehl V, Schultz-Coulon H & zur Hausen H. Molecular cloning and characterization of human papillomavirus DNA from a laryngeal papilloma. *J. Virol.* 1982;44:393-400.
41. Law MF, Lancaster WD & Howley PM. Conserved polynucleotide sequences among the genomes of papillomaviruses. *J. Virol.* 1979;32:199-207.
42. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremmlau A, zur Hausen H. Structure and transcription of human papillomavirus type 18 and 16 sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314:111-114.
43. Durst M, Dzarlieva-Petrusevska RT, Boukamp P, Fusenig NE and Gissmann L. Molecular and cytogenetic analysis of immortalized human primary keratinocytes obtained after transfection with human papillomavirus type 16 DNA. *Oncogene* 1987;1:251-256.
44. Pirisi L, Yasumoto S, Fellery M, Doninger JK & DiPaolo JA. Transformation of human fibroblasts and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA. *J. Virol.* 1987;61:1061-1066.
45. Münger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM & Schlegel R. The E6 and E7 genes of human papillomavirus type 16 are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 1989;63:4417-4423.
46. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Tafur L, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Navarro C, Martos C, Ascunce N, et al. The causal link between human papillomavirus and invasive cervical cancer: a population-based case-control study in Columbia and Spain. *Int. J. Cancer* 1992;52:743-749.
47. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl Cancer Inst* 1995;87:796-802.
48. IARC Monograph on Evaluation of Carcinogenic Risks of Humans: Human Papillomaviruses Vol. 64 (IARC, Lyon, 1995).
49. <http://www.kcom.edu/faculty/chamberlain/Website/Lects/VIRAL.HTM>.
50. www.tulane.edu/~dmsander/WWW/335/Papovaviruses.html
51. Favre M. Structural polypeptides of rabbit, bovine, and human papillomaviruses. *J. Virol.* 1975;15:1239-1247.
52. zur Hausen H. Papillomaviruses in Human cancers. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 1999;111:581-587.
53. Torrisi A, Del Mistro A, Onnis GI, Merin F, Bertorelle R, Minucci D. Colposcopy, cytology and HPV testing in HIV-positive and HIV-negative women. *Eur. J. Gynecol. Oncol.* 2000;21:168-172.
54. Van Rants M, Tachezy R, Burk RD. Human papillomavirus types: a neverending story. In *Papillomavirus reviews*, Lacey C (ed.). Leeds University Press: Leeds, 1996;1-20.
55. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Srijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12-9.
56. Huang S, Afonina I, Miller BA, Beckmann AM. Human papillomavirus types 52 and 58 are prevalent in cervical cancers from Chinese women. *Int J Cancer.* 1997;70: 408-11.

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

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

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

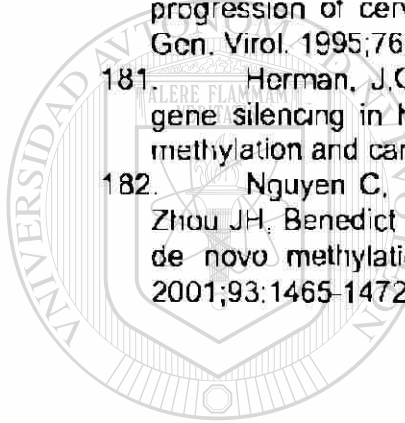
110. Riggs AD: X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet* 1975;14:9.
111. Holliday R, Pugh JE: DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*. 1975;187:226.
112. McGhee JD, Ginder GD: Specific DNA methylation sites in the vicinity of the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

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

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Itzel Evelyn Calleja Macias

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería

Genética.

Tesis: **EVALUACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA Y EPIGENÉTICA DEL HPV EN UNA POBLACIÓN DEL NORESTE DE MÉXICO.**

Campo de estudio: Medicina Molecular

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Biografía: Nacida en Xalapa, Veracruz el 14 de Diciembre de 1974, hija de Laura Macias Hernández y Ricardo Calleja Arroyo.

Educación: Egresada de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Veracruzana, en Xalapa, Veracruz. Grado obtenido: Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo en 1998.

Maestría en Ciencias con Especialidad en Biología Molecular e Ingeniería Genética otorgado por la Universidad Autónoma de Nuevo León en 2000.

Genomic diversity of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 isolates in a Mexican population and relationship to European, African, and Native American variants

Itzel E. Calleja-Macias,^{a,b} Mina Kalantari,^a John Huh,^a Rocio Ortiz-Lopez,^b Augusto Rojas-Martinez,^b Juan F. Gonzalez-Guerrero,^c Anna-Lise Williamson,^d Björn Hagmar,^e Dorothy J. Wiley,^f Luis Villarreal,^a Hans-Ulrich Bernard,^{a,*} and Hugo A. Barrera-Saldaña^b

^aDepartment of Molecular Biology and Biochemistry, University of California Irvine, Irvine, CA 92697 USA

^bDepartamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, 64460 Mexico

^cCentro Universitario Contra el Cáncer, Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Mexico

^dNational Health Laboratory Service and Institute of Infectious Disease and Molecular Medicine, Faculty of Health Sciences, University of Cape Town, South Africa

^eDepartment of Pathology, National Hospital, Oslo, Norway

^fSchool of Nursing, University of California Los Angeles, Los Angeles, CA 90095 USA

Received 2 September 2003; returned to author for revision 4 November 2003; accepted 7 November 2003

Abstract

Cervical cancer, mainly caused by infection with human papillomaviruses (HPVs), is a major public health problem in Mexico. During a study of the prevalence of HPV types in northeastern Mexico, we identified, as expected from worldwide comparisons, HPV-16, 18, 31, and 35 as highly prevalent. It is well known that the genomes of HPV types differ geographically because of evolution linked to ethnic groups separated in prehistoric times. As HPV intra-type variation results in pathogenic differences, we analyzed genomic sequences of Mexican variants of these four HPV types. Among 112 HPV-16 samples, 14 contained European and 98 American Indian (AA) variants. This ratio is unexpected as people of European ethnicity predominate in this part of Mexico: Among 15 HPV-18 samples, 13 contained European and 2 African variants, the latter possibly due to migration of Africans to the Caribbean coast of Mexico. We constructed phylogenetic trees of HPV-31 and 35 variants, which have never been studied. Forty-six HPV-31 isolates from Mexico, Europe, Africa, and the United States (US) contained a total of 35 nucleotide exchanges in a 428-bp segment, with maximal distances between any two variants of 16 bp (3.7%), similar to those between HPV-16 variants. The HPV-31 variants formed two branches, one apparently the European, the other one an African branch. The European branch contained 13 of 29 Mexican isolates, the African branch 16 Mexican isolates. These may represent the HPV-31 variants of American Indians, as a 55% prevalence of African variants in Mexico seems incomprehensible. Twenty-seven HPV-35 samples from Mexico, Europe, Africa, and the US contained 11 mutations in a 893-bp segment with maximal distances between any two variants of only 5 mutations (0.6%), including a characteristic 16-bp insertion/deletion. These HPV-35 variants formed several phylogenetic clusters rather than two- or three-branched trees as HPV-16, 18, and 31. An HPV-35 variant typical for American Indians was not identifiable. Our research suggests type specific patterns of evolution and spread of HPV-16, 18, 31, and 35 both before and after the worldwide migrations of the last four centuries. The high prevalence of highly carcinogenic HPV-16 AA variants, and the extensive diversity of HPV-18, 31, and 35 variants with unknown pathogenic properties raise the possibility that HPV intra-type variation contributes to the high cervical cancer burden in Mexico.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Genomic diversity; Papillomavirus; Population

Introduction

Persistent infection with “high-risk” human papillomaviruses (HPVs) is the primary cause of cervical cancer (IARC, 1995; Liaw et al., 1999; Munoz, 2000; Schiffman

* Corresponding author. Department of Molecular Biology and Biochemistry, University of California Irvine, Irvine, CA 92697-3900. Fax: +1-949-824-8551.

E-mail address: hbernard@uci.edu (H.-U. Bernard).

Costa et al., 2002; Giannoudis et al., 2001; Kammer et al., 2000, Villa et al., 2000; Xi et al., 1997; Xi et al., 1998), and likely contribute to geographic disparities

Some of us (J.E.C.M., R.O.L., A.R.M., J.F.G.G., and H.A.B.S.) are participating in a large ongoing epidemiolog-

ical study that aims to establish the relative prevalence of HPV types in women living in and around the city of Monterrey in the Mexican state of Nuevo Leon to identify high-risk HPV carriers for early intervention and to lay the foundation for future DNA diagnostic services and vaccina-

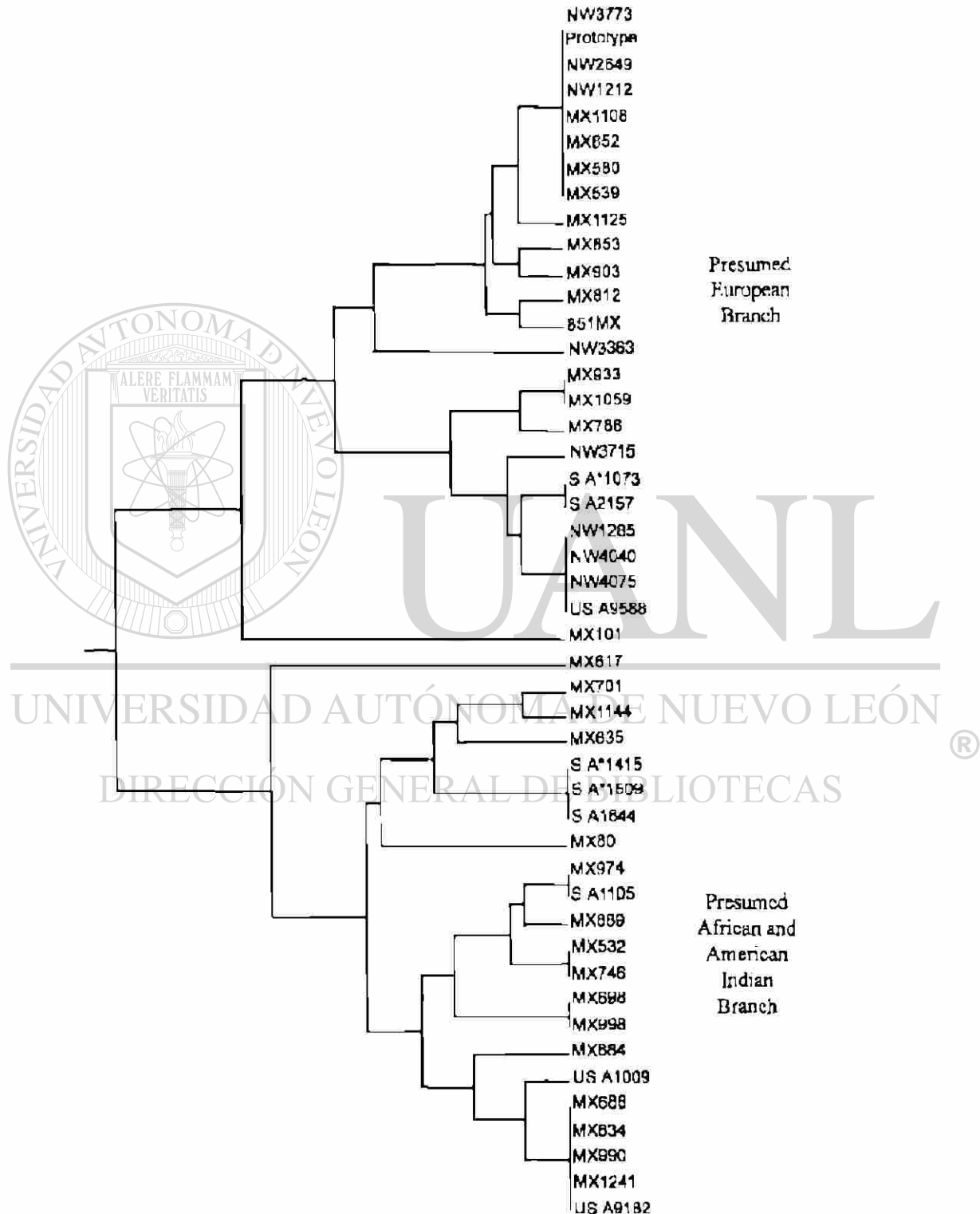


Fig. 3. Phylogenetic tree of HPV-31 variants from Mexico, Norway, South Africa, and the United States of America. The variants are identified with the acronyms MX, NW, SA, and US according to the respective country of origin, and a number identifying the specific sample within the local collections.

and a variant differing in the diagnostic genomic fragment (genomic position 7450–7850) in a single position, 7521. AA variants are characterized by mutations in the positions 7485, 7489, 7669, 7764, and 7786. These genomic positions refer to the revised sequence of HPV-16. The position 7521 is identical to position 7519, and the other five mutations to 7483, 7487, 7667, 7762, and 7784 in the original phylogenetic classification (Ho et al., 1993).

We have detected in this Mexican cohort among 1200 smears 112 samples with HPV-16, 98 of these with variants from the AA branch, and 14 with European variants (Fig. 1).

European and African HPV-18 variants in a Mexican cohort

The HPV-18 reference clone is a Brazilian isolate and likely a representative of HPV-18 variants of American Indians. The LCR of European variants differs from this clone by mutations in the position 7529, 7567, 7592, and 7570, and African variants by additional 10 nucleotide changes in a 320-bp segment (Ong et al., 1993). Maximal differences between any two variants are 7.3%. Here, among

15 Mexican isolates, we found 13 belonging to the European cluster and 2 African variants (Fig. 1).

Mexican variants belong to both branches of a newly determined intra-type phylogenetic tree of HPV-31

HPV-31 was with 29 samples, the second most common HPV type in the Monterrey cohort. The genomic diversity of HPV-31 isolates has never been studied. Therefore, we amplified and sequenced from these isolates a 523-bp segment between the genomic positions 7527–137, which included the homologous part with the viral enhancer of the diagnostic 400-bp HPV-16 segment. In order to approach a hypothesis about a potential ethnic origin of the Mexican samples, we included in our analysis eight samples from European patients (Norway) and six samples from African patients or patients with mixed African ethnicity from South Africa.

In all isolates together, we detected nucleotide exchanges in 28 positions, and single nucleotide deletions in 7 additional positions (Fig. 2) in altogether 25 different variants. The



Fig. 5. Phylogenetic tree of HPV-35 variants from Mexico, Norway, South Africa, and the United States of America.

maximal distance between any two variants was 16 bp (3.1%), similar to that among HPV-16 variants (3.6%) (Fig. 2).

Phylogenetic trees, calculated either by the UPGMA or the NJ algorithm, placed all HPV 31 variants on two branches, one with all Norwegian variants and the original German reference clone. The other branch contained no European, but four of the six South African isolates. This asymmetric distribution suggests that the first branch jumps original European variants, the second one African variants. The first and second branch contained 13 and 16 Mexican and 1 and 2 US isolates, respectively (Fig. 3).

Several phylogenetic clusters of HPV-35 variants unite Mexican, European and African isolates

HPV-35 was, with seven samples, the fourth most common HPV type in the cohort. The original HPV-35 clone has been isolated in the United States, and the ethnicity of the patient is unknown. The correct sequence of this HPV-35 isolate has been published under the abbreviation HPV-35h (see http://hpv-web.lanl.gov/stdgen/virus/hpv/compendium/htdocs/HTML_FILES/HPVcompintro4.html#comp94 in Myers et al., 1994), because a prior published sequence contained a large number of sequencing errors. Since only a single additional variant genome of this type has ever been reported (Stewart et al., 1996), we compared the Mexican isolates with 5, 10, and 5, respectively, HPV-35 samples from the same European, African, and US cohorts that had entered the HPV-31 study. For this comparison, we amplified an 893-bp genomic segment between positions 7146 and 187, and detected, in addition to the prototype, altogether 8 variants with a total of 10 nucleotide exchanges and a 16-bp insertion (Fig. 4). Maximal distances between any two variants were five mutations (0.6%). These HPV-35 variants formed several variant clusters rather than two- or three-branched trees as HPV-16, 18, and 31 (Fig. 5). All Mexican and Norwegian and three of the five US samples had a characteristic 16-bp insertion and differed within and between the two geographic cohorts by a single point mutation. Absence of the 16-bp insertion was specific for the reference clone and some of the South African isolates. We found another isolate of the reference clone a second time in the US, as well as another variant without the insertion.

Discussion

Our research shows that each of the four most prevalent HPV types exists in this Mexican cohort in form of numerous variants with significant genomic differences, which raises the possibility that these variants exhibit intra-type biological and pathogenic differences. Once DNA diagnosis or vaccination programs are considered for this population, it should be examined whether the diagnostic tools or epitopes are affected by mutations elsewhere in the genomes of these HPV-16, 18, 31, and 35 variants.

All variants of HPV-16 could be unequivocally assigned to either the European or the American Indian branch of the HPV-16 phylogenetic tree. HPV-16 is the only type for whom it is well confirmed by numerous epidemiological (Becker et al., 1994; Berumen et al., 2001; Da Costa et al., 2002; Franco et al., 1999; Giannoudis and Herrington, 2001; Giuliano et al., 1999; Xi et al., 1997, 1998) and molecular biological (Kammer et al., 2000; Villa et al., 2000) studies that genomic variation correlates with altered biological and epidemiological properties, which apparently result in increased carcinogenicity of African and AA variants. Except in American Indians and some Asian populations, AA variants are frequent in peoples with an American Indian component (Berumen et al., 2001; Lizano et al., 1997), but elsewhere, they were only found in Spain (Yanada et al., 1997), possibly because of reverse migration from Latin America.

The prevalence of 88% of the HPV-16 AA variant in this Mexican cohort is the highest ever detected in any part of the world. This observation and data from the papers cited above make it possible that exposure to the AA variants of HPV-16 contributes to the increased risk of Mexican women to develop cervical cancer. The high ratio of AA variants in Nuevo Leon is astonishing, as a large part of the population of this Mexican state is considered to be ethnically of Spanish origin, and even among individuals explicitly categorized as Mestizos, the admixture of Indian genes has been measured as maximally 40%, with 55% European and maximally 5% African genetic markers (Cerdeña-Flores et al., 2002). As HPV-16 infects the vast majority of all human populations, one might expect that the spread of the virus follows similar characteristics as the spread of host genes. It may be interesting to address the question of whether behavioral components explain this disparity, or whether HPV-16 AA variants spread more efficiently than E variants.

Alternatively, it may be that migration has significantly affected virus distribution in this region if groups that might once be kept apart by vast distances are mixing sexually. Population movements between Central American populations, Mexico, and Hispanic populations in the United States are well documented, and these migrations likely increase the chance of sexual contact between an emigre and men or women of the host culture. Ultimately, these social influences may heighten a Monterey woman's risk for acquiring viral variants that were historically absent or rare in this population.

The number of HPV-18 samples is too low for any conclusions. A predominance of European variants, as observed, would be expected, and the presence of African variants is a distinct possibility because of an ethnic African element in this population. The absence of the HPV-18 prototype from these samples is noteworthy, as this is a Brazilian isolate that had frequently been found again in South American cohorts (Ong et al., 1993).

We determined phylogenetic trees of HPV-31 and 35 variants based on LCR segments of these viruses that

overlapped with and extended the homologous segments of HPV-16 and HPV-18 that had been used for phylogenetic evaluations. HPV-31 variants are separated into two deep phylogenetic branches. It seems likely that the first branch with all European variants and 13 out of 29 Mexican isolates represents typical European HPV-31 genomes. The second branch with 4 of 6 African and 16 out of 29 Mexican isolates are difficult to assess. It seems reasonable to suggest that it may represent the original HPV-31 genomes of American Indians, because it would be difficult to explain a high prevalence of African isolates in a country with only a very small fraction of African immigrants. This phylogenetic similarity of African and American Indian variants would be somewhat reminiscent to the situation in HPV-16, where American Indian (AA) and African variants are more closely related to one another than to European variants.

HPV-35 variants fall into two categories, identified by the presence or absence of a 16-bp segment absent from the HPV-35 reference clone and four of nine African isolates. As this distinction has to be counted as a single mutation, this genomic difference as well as the generally low number of nucleotide differences does not allow establishing a stable tree for HPV-35 variants. Since all Mexican isolates are identical to some European or some African isolates, this cohort suggests that the HPV-35 type was either absent from America in pre-Columbian times or that American Indian HPV-35 variants were indistinguishable from those in Europe and Africa.

About 30% of all malignant tumors in women in Mexico are uterine cervix carcinomas (Gonzalez-Garay et al., 1992; Hernandez-Avila et al., 1993; Silva et al., 1999; Torroella-Kouri et al., 1998), making this cancer a leading oncological concern of public health. While this high prevalence likely will have some behavioral explanations and may also be caused by lack of appropriate medical care (Lazcano-Ponce et al., 1999a, 1999b), our data raise the possibility that the specific viral load, that is, a unique epidemic with variants of HPV types that differ from those in Europe and the United States, contributes to this problem.

Materials and methods

Clinical specimens and DNA preparation

Among a cohort of 1200 consecutive women from several primary health care centers in Monterrey, Nuevo Leon, Mexico, a total of 161 specimens were positive for the four most common HPV types, namely 112 for HPV-16, 29 for HPV-31, 20 for HPV-18, and 7 for HPV-35 positive samples. All of these samples entered this study (designated as MX-Z, Z being the code number of the patients), except five samples with HPV-18 with insufficient DNA. These samples had been taken in the form of swabs during a large ongoing epidemiological study that will be published elsewhere by some of us (I.E.C.M., R.O.L., A.R.M., J.F.G.G., and H.A.B.S., in preparation). The 13 Norwegian swabs (NW-Z) were collected in Oslo, Norway, during gynecological consultations of these patients. Sixteen South Africa specimens (swabs) from Cape Town excluded white patients but were from two different ethnic groups that we refer to as black (SA*-Z) and mixed race (SA-Z) women. For all three cohorts, cytological diagnoses were done after obtaining these samples, and the clinical outcome did not influence the inclusion in this study. The samples from the United States of America were obtained in Los Angeles and derived from biopsies of anal neoplastic lesions in patients positive for infection with the human immunodeficiency virus. The use of these samples was approved by the Institutional Review Board of the University of California Irvine, and collection followed the respective patient protection rules of each of the four participating clinics in Monterrey, Oslo, Cape Town, and Los Angeles. Cervical DNA was extracted and purified following standard techniques. Briefly, the samples were digested with proteinase K, and the DNA was purified with phenol chloroform. The specific HPV types were determined by PCR amplification with MY09/11 primers and sequencing as previously described (Bernard et al., 1994).

Table 1
Location and sequence of primers used in PCR amplification and sequencing reactions

LCR HPV type	Name	Location	Sequence (5'-3')
HPV-16 ^a	7478	7478-7477	GGGGTACCTCGGGTTGCATGCTTTTTCGG
	7841	7861-7841	GGTCTAGACGGTTTCCACACACCCCATGT
HPV-21	HPV31-8aF	7527-7550	AGTACTTCTCGGGTTTTTGTGGTTTC
	HPV31-8aR	114-137	CCGAGGTCCTTCTCAGGATTTTT
HPV-18 ^b	7485	7485-7484	TCGGTTGCCTTTGGCTATG
	7805	7806-7825	CGGTTGCATAAALCATATCAT
HPV-35	HPV35LCR-F	7146-7172	TATATTATGTTGTGGTGCCTGTTTG
	HPV35LCR-R	163-187	AAATTCATGGATGCTTTCTTCTACC
	HPV35LCRa-F	7418-7439	CGATTCGGTTGCTGTTGGTAAG
	HPV35LCRa-R	11-33	CGTTTTCGGTCACCTCCCTGTTTT

The HPV-16 and 18 primers have been introduced by Ho et al. (1991) and Ong et al. (1993).

^a Primers published by Ho et al. (1991).

^b Primers published by Ong et al. (1993).

PCR and DNA sequencing of LCR

A major segment of the LCR region was amplified with primer pairs specific for each HPV type. Table 1 lists sequences and locations of the primers. Reaction mixtures contained 20 mM Tris (pH 8.0), 100 mM KCl, 200 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 2 mM MgCl₂, 10 mM each of the sense and antisense oligonucleotide primer, and 1 unit of Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI), although Go Taq DNA Polymerase (Promega) was used for HPV-16 amplification. Forty amplification cycles were run in the Eppendorf Master Cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) with a 94 °C denaturing step (30 s), a 60 °C annealing step (30 s), and a 72 °C extension step (1 min), including a denaturing step of 4 min and a final extension of 5 min.

PCR products were visualized by ethidium bromide agarose gel electrophoresis and purified by the QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). The products were treated with 2 units of shrimp alkaline phosphatase and 10 units of exonuclease I (USB, Cleveland, OH) at 37 °C for 1 h to clean the reaction from primers and dNTPs. The enzymes were subsequently inactivated by heating at 72 °C for 20 min. The products were sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Perkin Elmer Applied Biosystems, CA). For each sample, two independent PCR products were generated and sequenced from both orientations and internal primers (Table 1) to exclude PCR artifacts. Sequence changes that were found at least twice in the same sample were counted as variants.

Sequence analysis

Sequence analysis was performed with ALIGN at the GENESTREAM network server as published by Pearson et al. (1997) to compare the HPV variant sequences with those of the reference sequences. In this study, the nucleotide positions of the HPV-18, HPV-31, and HPV-35 genomes were numbered according to the reference sequences NC 001357, NC 001527, and X74477, respectively. HPV-16 sequence and base positions are numbered according to the last update of the HPV-16 reference genome sequence (Los Alamos National Laboratory, <http://hvp-web.lanl.gov/stidgen/virus/hpv/compendium/hidncs/>). The HPV-35 sequence reference used in this study was HPV-35H in the same database, because of multiple errors in the original HPV-35 sequence.

Phylogenetic analysis

HPV-16 and HPV-18 variants were compared with those forming published phylogenetic branches (Ho et al., 1991, 1993; Ong et al., 1993; Stewart et al., 1996). Phylogenetic analyses of HPV-31 and HPV-35 variants were performed using MEGA version 2.1 as published by Kumar and Gadagkar (2001). The phylogenetic trees were determined

using the unweighted pair-group method with arithmetic average (UPGMA) and Neighbor joining (NJ) method.

Nucleotide-sequence accession numbers

The nucleotide sequences of all new HPV-31 and HPV-35 variants have been entered into GenBank with the accession numbers AY453865–AY454064.

Acknowledgments

We are grateful to Drs. Maria E. Diaz-Garcia, Patricia Lopez-Reyes, and Cesar H. Rosas-Huerta for support of this study, and Bruce R. Allan for typing the samples from Cape Town. We also acknowledge Roche Molecular Systems for provision of reagents for typing HPVs in the Cape Town samples. This research was funded by a Collaborative Research Grant from UC MEXUS-CONACYT to I.C., L.V., H.A.B.S., and H.U.B., and by funding of the work of H.U.B. by the Cancer Research Institute of the University of California Irvine, and NIH grant ROI CA-91964 to H.U.B.

References

- Becker, J.M., Wheeler, C.M., McGough, N.S., Parmenter, C.A., Jordan, S.W., Sidley, C.A., McPherson, R.S., Dorris, M.H., 1994. Sexually transmitted diseases and other risk factors for cervical dysplasia among southwestern Hispanic and non-Hispanic white women. *JAMA* 271, 1181–1188.
- Bernard, H.U., Chen, S.Y., Manos, M.M., Ong, C.K., Villa, L.L., Delius, H., Binner, H.M., Peyton, G., Wheeler, C.M., 1994. Assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction, restriction digest, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J. Infect. Dis.* 170, 1077–1085.
- Bruner, J., Ordoñez, R.M., Lazcano, E., Salmeron, J., Galvan, S.C., 2001. Asian-American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1325–1330.
- Bose, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., Shah, K.V., 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 87, 796–802.
- Castillejos, X., Munoz, N., 2003. Chap. 3: Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis—Role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 31, 20–28.
- Cerdas-Flores, R.M., Budowle, B., Jin, L., Barton, S.A., Deka, R., Chakraborty, R., 2002. Maximum likelihood estimates of admixture in Northeastern Mexico using 13 short tandem repeat loci. *Am. J. Human Biol.* 14, 429–439.
- Chen, S.Y., Delius, H., Halpern, A.L., Bernard, H.U., 1995. Analysis of genomic sequences of 55 papillomavirus types: typing, phylogeny, and taxonomy. *J. Virol.* 69, 3074–3083.
- De Cosm, M.M., Hogeboom, C.J., Holly, E.A., Palefsky, J.M., 2002. Increased risk of high-grade anal neoplasia associated with a human papillomavirus type 16 E6 sequence variant. *J. Infect. Dis.* 185, 1229–1237.
- Frenn, E.L., Villa, L.L., Sobrinho, J.P., Prado, J.M., Rousseau, M.C., Desy, M., Robon, T.F., 1999. Epidemiology of acquisition and clear-

- ance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J. Infect. Dis.* 180, 1415–1423.
- Gianoudis, A., Herrington, C.S., 2001. Human papillomavirus variants and squamous neoplasia of the cervix. *J. Pathol.* 193, 295–302.
- Gianoudis, A., Duin, M., Snijders, P.J., Herrington, C.S., 2001. Variation in the E2-binding domain of HPV-16 is associated with high-grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Br. J. Cancer* 84, 1058–1063.
- Giuliano, A.R., Papenfuss, M., Schneider, A., Nour, M., Hatch, K., 1999. Risk factors for high-risk type human papillomavirus infection among Mexican American women. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* 8, 615–620.
- Gonzalez-Garay, M.L., Barrera-Saldana, H.A., Aviles, L.B., Alvarez-Salas, L.M., Gariglio, P., 1992. Prevalence in two Mexican cities of human papillomavirus DNA sequences in cervical cancer. *Rev. Invest. Clin.* 44, 491–499.
- Hocht, J.L., Kadish, A.S., Jiang, G., Burk, R.D., 1995. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int. J. Cancer* 60, 369–376.
- Hernandez-Avila, M., Lazzcano-Ponce, E.C., de Ruiz, P.A., Romieu, L., 1998. Evaluation of the cervical cancer screening programme in Mexico: a population-based case-control study. *Int. J. Epidemiol.* 27, 370–376.
- Ho, L., Chan, S.Y., Chew, V., Cheng, T., Tay, S.K., Villa, L.L., Bernard, H.U., 1991. Sequence variants of human papillomavirus type 16 in clinical samples permit verification and extension of epidemiological studies and construction of a phylogenetic tree. *J. Clin. Microbiol.* 29, 1765–1772.
- Ho, L., Chan, S.Y., Burk, R.D., Das, B.C., Fujinaga, K., Iconoglu, J.P., Kahn, T., Kiviat, N., Lancaster, W., Mavroum, P., Labropoulou, V., Mitran-Rosenbaum, S., Norrild, B., Pillai, M.R., Stoerker, J., Syrjänen, K., Syrjänen, S., Tay, S.K., Villa, L.L., Wheeler, C.M., Williamson, A.L., Bernard, H.U., 1993. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and movement of ancient human populations. *J. Virol.* 67, 6413–6414.
- IARC: International Agency for Research on Cancer Monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1995. Human Papillomaviruses, vol. 64. IARC, Lyon.
- Kammer, C., Werthorst, U., Torres-Martinez, N., Wheeler, C.M., Pfister, H., 2000. Sequence analysis of the long control region of human papillomavirus type 16 variants and functional consequences for P57 promoter activity. *J. Gen. Virol.* 81, 1975–1981.
- Kjellberg, L., Hallmans, G., Ahnen, A.M., Johansson, R., Bergman, E., Wadell, G., Angstrom, T., Dilner, J., 2000. Smoking, diet, pregnancy and oral contraceptive use as risk factors for cervical intra-epithelial neoplasia in relation to human papillomavirus infection. *Br. J. Cancer* 82, 1332–1338.
- Kumar, S., Gadagkar, S.R., 2001. Disparity index: a simple statistic to measure and test the homogeneity of substitution patterns between molecular sequences. *Genetics* 158, 1321–1327.
- Lazzcano-Ponce, C., Moss, S., Alonso de Ruiz, P., Salmeron Castro, J., Hernandez Avila, M., 1999a. Cervical cancer screening in developing countries: why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch. Med. Res.* 30, 240–250.
- Lazzcano-Ponce, E.C., Castro, R., Allen, B., Najera, P., Alonso de Ruiz, P.A., Hernandez-Avila, M., 1999b. Barriers to early detection of cervical-uterine cancer in Mexico. *Women's Health* 8, 399–408.
- Liaw, K.L., Glass, A.G., Manos, M.M., Greer, C.E., Scott, D.R., Sherman, M., Burk, R.D., Kurman, R.J., Wacholder, S., Rush, B.B., Cadell, D.M., Lawler, P., Tabos, D., Schiffman, M., 1999. Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J. Natl. Cancer Inst.* 91, 954–960.
- Lizano, M., Garcia-Carranca, A., 1997. Molecular variants of human papillomavirus types 16, 18, and 45 in tumors of the uterine cervix in Mexico. *Gac. Med. Mex.* 133 (Suppl. 1), 43–48.
- Moodley, M., Moodley, J., Chetty, R., Herrington, C.S., 2003. The role of steroid contraceptive hormones in the pathogenesis of invasive cervical cancer: a review. *Int. J. Gynecol. Cancer* 13, 103–110.
- Munoz, N., 2000. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J. Clin. Virol.* 19, 1–5.
- Munoz, N., Bosch, F.X., de Sanjose, S., Herrero, R., Castellsague, X., Shah, K.V., Snijders, P.J., Meijer, C.J., 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 518–527.
- Myers, G., Bernard, H.U., Delius, H., Favre, M., Iconogel, J., van Ranst, M., Wheeler, C. (Eds.), 1994. Human Papillomaviruses. A Compilation and Analysis of Nucleic Acid and Amino Acid Sequences. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM, USA.
- Ong, C.K., Chan, S.Y., Campo, M.S., Fujinaga, K., Mavroum, P., Labropoulou, V., Pfister, H., Tay, S.K., ter Meulen, J., Villa, L.L., Bernard, H.U., 1995. Evolution of human papillomavirus type 18: an ancient phylogenetic root in Africa and intratype diversity reflect coevolution with human ethnic groups. *J. Virol.* 67, 6424–6431.
- Pearson, W.R., Wood, T., Zhang, Z., Miller, W., 1997. Comparison of DNA sequences with protein sequences. *Genomics* 46, 24–36.
- Schiffman, M.H., Branton, L.A., 1995. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 76, 1888–1901.
- Silva, H., Vargas-Alarcon, G., Zuniga-Ramos, J., Rodriguez-Retna, T.S., Hernandez-Martinez, B., Osnaya, N., Kofman, S., Torres Lobaton, A., Grandos, J., 1999. Genetic features of Mexican women predisposing to cancer of the uterine cervix. *Hum. Pathol.* 30, 626–628.
- Stewart, A.C., Eriksson, A.M., Manos, M.M., Munoz, N., Bosch, F.X., Peito, J., Wheeler, C.M., 1996. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J. Virol.* 70, 3127–3136.
- Torroella-Kouri, M., Morsberger, S., Carrillo, A., Mohar, A., Menses, A., Ibarra, M., Daniel, R.W., Ghaffar, A.M., Solorza, G., Shah, K.V., 1998. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol. Oncol.* 70, 115–120.
- Villa, L.L., Sicero, L., Rahal, P., Caballero, O., Ferenczy, A., Rohan, T., Franco, E.L., 2000. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J. Gen. Virol.* 81, 2959–2968.
- Xi, L.F., Koutsky, L.A., Galloway, D.A., Kuypers, J., Hughes, J.P., Wheeler, C.M., Holmes, K.K., Kiviat, N.B., 1997. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 796–802.
- Xi, L.F., Ciriachlow, C.W., Wheeler, C.M., Koutsky, L.A., Galloway, D.A., Kuypers, J., Hughes, J.P., Hawes, S.E., Strawicz, C., Goldbaum, G., Holmes, K.K., Kiviat, N.B., 1998. Risk of anal carcinoma in situ in relation to human papillomavirus type 16 variants. *Cancer Res.* 58, 3839–3844.
- Yamada, T., Manos, M.M., Peito, J., Greer, C.E., Munoz, N., Bosch, F.X., Wheeler, C.M., 1997. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J. Virol.* 71, 2463–2472.
- zur Hausen, H., 1996. Papillomavirus infections—A major cause of human cancers. *Biochim. Biophys. Acta* 1288, F55–F78.

Conserved Methylation Patterns of Human Papillomavirus-16 DNA in Asymptomatic Infection and Cervical Neoplasia.

Mina Kalantari (1), Itzel E. Calleja-Macias (1,2), Devansu Tewari (3), Bjørn Hagmar (4), Kathrine Lie (5), Hugo A. Barrera-Saldana (2), Dorothy J. Wiley (6), and Hans-Ulrich Bernard (1,7).

Running title: HPV-16 DNA methylation during cervical infections.

(1) University of California Irvine, Department of Molecular Biology and Biochemistry, Irvine, California 92697; (2) Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México 64460; (3) University of California Irvine, Department of Obstetrics and Gynecology, Orange, California; (4) Department of Pathology, National Hospital, Oslo, Norway; (5) Department of Pathology, the Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway; (6) University of California Los Angeles, School of Nursing, Los Angeles, CA 90095.

(7) corresponding author:

Department of Molecular Biology and Biochemistry, 114 Sprague Hall, University of California, Irvine, CA 92697-3900, USA

e-mail: hbernard@uci.edu

phone: 1-949-824-5162

fax: 1-949-824-8551

ABSTRACT.

DNA methylation contributes to the chromatin conformation that represses transcription of the human papillomavirus-16, which is prevalent in the etiology of cervical carcinoma. In an effort to clarify the role of this phenomenon in the regulation and carcinogenicity of HPV-16, 115 clinical samples were studied to establish the methylation patterns of the 19 CpG dinucleotides within the long control region and part of the L1 gene by bisulfite modification, PCR amplification, DNA cloning and sequencing. We observed major heterogeneities between clones from different samples as well as between clones from individual samples. The methylation frequency of CpGs was measured at 14.5%. In addition, 0.21 and 0.23%, respectively, of the CpA, and CpT sites, indicators of de novo methylation, were methylated. Methylation frequencies exceeded 30% in the CpGs overlapping with the L1 gene and were about 10% for most other positions. A CpG site located in the linker between two nucleosomes positioned over the enhancer and promoter of HPV-16 had minimal methylation. This regions forms part of the HPV replication origin, and is close to binding sites of master-regulators of transcription during epithelial differentiation. Methylation of most sites was highest in carcinomas, possibly due to tandem repetition and chromosomal integration of HPV-16 DNA. Methylation was lowest in dysplasia, likely reflecting the transcriptional activity in these infections. Our data document the efficient targeting of HPV genomes by the epithelial methylation machinery, possibly as a cellular defense mechanism, and suggest involvement of methylation in HPV oncogene expression and the early-late switch.

INTRODUCTION.

The spread of human papillomaviruses (HPV) into mucosal and cutaneous epithelia can result either in a clinically asymptomatic infection not associated with pathological changes or the development of neoplastic disease. While the host immune system likely plays a role in the elimination of the virus, it is unclear which factors determine whether an infection leads to long-term persistence in the absence of symptoms or to neoplastic

progression. The understanding of these alternative outcomes is important in the case of the 18 "high-risk HPV types" that are most frequently associated with cervical carcinomas. Population-based data suggest that "high risk" HPV infections occur frequently relative to the number of carcinomas that result. Cervical cancer cases generally number in fewer than hundreds of cases per 100,000 women, while the incidence rate of becoming infected at least once during the life is believed to significantly exceed 50% (6,35,46,49). Further research is needed to discriminate whether there are two different stages of infection, namely asymptomatic productive infection and latency. In the latter case the virus would be maintained not only without changes to the host cell, but also without production of viral particles. While the former may represent immunological delays or failures, the latter may serve as a model for malignancies that evolved late in life.

The regulation of HPV oncogene transcription as a major modulator of productive HPV infections is a focus of debate. It has been reported that HPV oncogene transcription is only active in differentiating epithelial cells, but is repressed in undifferentiated cells by the factors CDP and YY1, which alter, in collaboration with histone deacetylases (HDACs) the chromatin conformation in ways unfavorable to transcription (1,26,39).

This mechanism was identified *in vitro* by transcriptional studies and is supported by immunocytochemical data of HPV infected tissue *in situ* (37). A second example are data that glucocorticoids and progesterones increase HPV oncogene transcription (11,29). These molecular mechanisms may explain the increased risk of cervical carcinogenesis by multiparity, use of antiovolants (35), and possibly stress. Yet another mechanism is based on the observation that transcriptional stimulation results from the insertion of HPV genomes into cellular chromosomes during cancer progression. This event interrupts a negative feedback loop (36,43) and stimulates transcription depending upon nuclear matrix attachment regions (38).

DNA methylation provides an additional means to regulate HPV transcription since the repression of cellular and viral gene expression can occur by the introduction of methyl groups to cytosine residues (5,14,19,20,27,31,48). Methylated cytosines are maintained

in a stable form when they occur in the palindrome CpG (mCpG) (23). mCpGs can result in displacement of transcription factors (44), but more often lead to changes of the chromatin configuration under the influence of histone deacetylases (HDACs) (21). This mechanism resembles the modifications triggered by complexes between HDACs and the transcription factors CDP and YY1, since HDACs can either form complexes directly with the DNA methylases or with the repressors of the MeCP2 family, which recognize and bind mCpGs (5,8,21).

Previous reports more than twenty years ago on HPV-1 and the cottontail rabbit papillomavirus suggested that papillomaviruses are targeted by cellular DNA methylation, although limited analytical power, namely methylation sensitive restriction enzymes, was accepted as the state of the art of that time (9,13,40,47). Research on the methylation of HPVs was extended recently to the high-risk HPV type HPV-16 (2,22) by bisulfite modification and DNA sequencing. Ongoing pilot studies confirmed the occurrence of DNA methylation in HPV-6, 11, 18, and 31 (1a, and our unpublished observations). The consequence of CpG methylation is repression of HPV transcription as shown by transfection of in vitro methylated HPV DNA (34) and by in vivo studies with the cell lines CaSki and SiHa (2,45). Our research concentrates presently on HPV-16, the most prevalent HPV type in cervical carcinoma (6). The observations cited above provide evidence for three mechanisms, which may occur concomitantly, namely for methylation (i) of HPV-16 genomes in episomal form in cells in asymptomatic smears, (ii) of HPV-16 genomes that form tandem arrays in cancer lesions, and (iii) for de novo methylation in a somatic tissue, namely mucosal epithelium.

The goal of the present study was to further investigate the methylation patterns of the CpG dinucleotides contained within the long control region and L1 region of the HPV-16 genome in a large collection of clinical samples of the human cervix. We wanted to determine whether a thoroughly studied segment of the HPV-16 genome follows defined methylation patterns and whether certain CpG sites are targeted more or less frequently depending upon the state of the cervical infection. In addition, we wanted to estimate the amount of de novo methylation in an HPV infected cell population by measuring

methylation in other dinucleotides besides CpGs, namely CpAs, CpTs, and CpCs. Each of these issues were addressed by the sequencing of multiple HPV-16 genomes from individual samples to further characterize the hetero- or homogeneity of methylation within each lesion while also addressing the relationship between the observed patterns as they relate to the presence or absence of clinical disease.

MATERIALS AND METHODS.

Origin of samples. CaSki cells had served for two decades as a paradigm of a cervical carcinoma derived cell line with 500 chromosomally recombined HPV-16 genomes. All clinical samples were archival. The carcinoma samples were fresh frozen, stored at -70°C and histologically confirmed before and after DNA extraction. The samples were obtained from three sources, namely from patients examined and treated by two of us (B.H. and K.L.) in Oslo, Norway (21 from asymptomatic patients, 17 from CIN I to III grade lesions, 29 from squamous carcinomas), from patients examined during regular gynecological diagnosis in several different hospitals in Monterrey, Mexico, as published by us recently (10) (30 from asymptomatic patients, 13 from cervical carcinomas), and from the Cancer Center of the University of California Irvine (five cervical carcinomas).

DNA preparations. All DNA preparations were done with Qiagen DNA purification kits to assure removal of protein contaminations.

Bisulfite modifications. For bisulfite treatment (16), 50-1000 ng sample DNA supplemented with one μg of salmon sperm DNA in a total volume of 18 μl in water were denatured with 2 μl of 3M NaOH and incubated at 37°C . After denaturing, 278 μl of 4.8M sodium bisulfite and 2 μl 100 mM hydroquinone were added and incubated in a thermal cycler for 20 cycles each at 55°C for 15 minutes and 95°C for 30 seconds. The modified DNA was desalted with the QIAquick PCR purification protocol. The modified DNA was desulfonated by adding 5.5 μl of 3M NaOH, 5 μg glycogen and incubation at 37°C for 15 minutes. The DNA was precipitated with 5.6 μl of sodium acetate and 150 μl

of 100% ethanol. The pellet was washed with 70% ethanol and dissolved in 30-50 μ l TE buffer (10mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA).

Polymerase Chain Reactions, Primers, T/A cloning and DNA sequencing. The modified DNA was amplified in form of three amplicons: Part of the L1 gene and the 5' LCR with the primers 16msp3F (position 7049-7078, AAGTAGGATTGAAGGTTAAATTAAAATTTA) and 16msp3r (position 7590-7560, AACAAACAATACAAATCAAAAAACAAAAA); the HPV-16 enhancer with the primers 16msp4F (position 7465-7493, TATGTTTTTTTGGTATAAAAATGTGTTTTT) and 16msp7R (position 7732-7703, TAAATTAATTAAAACAAACCAAAAATATAT); and the HPV-16 promoter with the primers 16msp5F (position 7748-7777, TAAGGTTTAAATTTTAAAGGTTAATTAAT) and 16msp8R (position 115-86, ATCCTAAAACATTACAATTCTCTTTTAATA). The sequences of the primers were designed according to the genomic sequence of HPV-16 (24) assuming conversion of all cytosine residues into uracils. PCR was carried out in a 25 μ l volume containing 0.2 mM of each of the four dNTPs, 10pmol of the primers, 2 mM $MgCl_2$ and 1 unit of Ampli Taq Gold (Perkin-Elmer). The PCR started at 94°C for 1 min, followed by 40 amplification cycles (denaturing at 94 °C for 10 sec, annealing at 58 °C for 30 sec and extension at 68 °C for 1min) with final extension at 68 °C for 7 min. The presence of PCR products was verified by agarose gel electrophoresis, and confirmed amplicons were cloned with the TOPO TA cloning kit for sequencing (Invitrogen). Cloned DNAs were sequenced by Big Dye terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems).

Statistical analysis. Descriptive and tabular statistics were used to explore these data. Graphical representations of the CpG methylation frequency were estimated from the data. For some sites, DNA could not be amplified and data were treated as missing for these analysis. The frequency of methylation of each CpG, CpA, and CpT site was compared among three diagnostic outcome groups: squamous cell carcinoma, cervical intraepithelial neoplasia (CIN), and specimens from asymptotically infected women (no identifiable lesion, NIL). The Fisher's Exact Test was used to test the hypotheses that the methylation frequencies for cancers and CINs were each greater than the methylation

frequency of specimens from asymptotically infected women. Additionally, the Student's *t* Test was used to test the hypotheses that the observed methylation frequency at each site in each diagnostic outcome category was statistically significantly greater than zero. A total of ninety-five statistical comparisons were performed and we adjusted the level of significance for our statistical tests by using Bonferroni's adjustment for multiple comparisons. The frequency of methylation on the many CpA and CpT sites examined was small; thus, *p*-values less than 0.05 are reported, even though they may not meet the most stringent test limits of multiple comparisons.

RESULTS.

Study design. We approached this study intending to expand upon the manner in which we previously had investigated CpG methylation of HPV-16 DNA. Our original observations were based upon bisulfite modified DNA from cell lines and clinical samples, which were then amplified with primers specific for the DNA in which the cytosine residues had been converted to uracil groups, followed by direct sequencing of the amplification product (2). At the beginning of our new study, we made observations with DNA from CaSki cells as well as with clinical samples (data not shown) that sequencing reactions frequently showed overlapping C and T signals, which could not be suppressed by changing the temperature or the length of the bisulfite reaction. We concluded that cell populations from the same source contained mixtures of HPV-16 genomes with CpGs or meCpGs in the same position. Therefore, we altered our protocol, cloned the amplicons in *E. coli* plasmids and randomly selected for sequencing five independent *E. coli* colonies derived from each sample. This was done in order to identify divergently methylated HPV-16 genomes assuming there may be similar amounts of methylated and unmethylated molecules. We acknowledge that it is impossible to analyze mixtures of methylated and unmethylated molecules in samples where one DNA type vastly outnumbers the other one.

The HPV-16 genome is a circular double-stranded DNA with a size of 7906 bp. An 850 bp segment between the 3' end of the L1 gene and the 5' end of the E6 oncogene is called the long control region (LCR), since it contains most of the cis-responsive elements that regulate transcription, which occurs unidirectionally toward the E6 gene (3). The principal transcriptional start site is called p97 or E6 promoter and is located five bp upstream of the ATG of the E6 gene. We decided to standardize the analysis by amplifying and sequencing a genomic segment between the positions 7079 and 85, which includes 19 CpGs. Three of these 19 CpGs were derived from the 3' end of the L1 gene (7091, 7136, and 7145), five from the 5'-segment of the LCR (7270 to 7461), which makes yet incompletely understood contributions to the transcriptional process (39,42), six from the transcriptional enhancer (7535 to 7862), and five from the E6 promoter (31-58). We selected this segment in order to detect possible correlations of methylation targets with known functional units of the HPV-16 genome.

It is well known that bisulfite modification does not only alter cytosine residues, but introduces nicks in DNA. As a consequence, it is impossible to PCR amplify with high efficiency large genomic segments with sizes exceeding a few hundred base pairs. Because of this limitation, we had to dissect the 913 bp region that we wished to analyze into three amplicons, spanning between the positions 7091 to 7461, 7535 to 7695, and 7862 to 58. In other words, while we aimed to gather methylation information from five HPV-16 DNA molecules from each sample, data for each of these three segments represent the methylation status of different, non-contiguous molecules.

During the analysis of clinical samples, we regularly included as negative and positive controls DNA from SiHa and CaSki cells. The only HPV-16 genome in SiHa has no meCpGs throughout the enhancer and promoter region. Previously published findings based on direct sequencing of the amplification product showed that most of the 500 endogenous HPV-16 genomes in CaSki cells appeared to be completely methylated throughout this region (2).

In order to standardize the analysis of the clinical samples in this study, we aimed to analyze five bisulfite modified, PCR amplified and bacterially cloned HPV-16 segments: 51 asymptomatic infections (NIL); 17 low and high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN); and 47 from cervical carcinomas for each of the 19 CpGs in the L1-LCR segment described above. This strategy aimed to give information about a total of 10,925 CpGs. Unfortunately, some of our samples did not contain sufficient DNA to complete this study, and in these cases (51 out of 115 samples) we had to eliminate the analysis of the L1 and 5'-LCR segment. As a result, our study reports the methylation status of only 8,885 CpG residues: 6,080 representing information about all 19 CpG residues in 320 clones, and 2,805 the methylation status of 11 CpGs in 255 clones from the enhancer and promoter.

It was not possible to confirm the physical state of HPV genomes in this study. It is generally accepted, however, that HPV genomes are episomal in latent infection and early dysplasia (CIN I), two of the pathological groupings we studied, while they are most often chromosomally integrated in carcinomas (12).

Heterogeneous DNA methylation patterns in the HPV-16 genomes of the CaSki cell

line. In a previous analysis (2) of HPV-16 DNA in CaSki cells involving one of us, amplicons were directly sequenced after bisulfite modification and PCR amplification, and the data obtained with this strategy suggested that all CpGs overlapping with the enhancer and promoter (positions 7535 to 58) were completely methylated in most viral copies (2). Here we report a re-analysis based on sequences of individual clones of modified and PCR amplified DNA, which also extended the analyzed segment in the 5' direction. In contrast to the published data, Fig. 1 shows that none out of 15 clones was completely methylated, but each clone contained between one and five (out of 19) unmethylated CpGs. None of five clones was methylated in position 7270 (which had not been previously analyzed), and methylation was infrequent at the positions 7535, 7554 and 7862. Based upon these findings, we conclude that the 500 HPV-16 genomes of CaSki cells are not homogeneously methylated, but that there are differences either among tandemly repeated intrachromosomal copies or between copies inserted in different

chromosomal locations (45). We reexamined this assumption by directly sequencing the bisulfite modified and PCR amplified products from several independent analyses of CaSki DNA. In these experiments we observed in all sequence readouts overlapping C and T peaks at the positions 7270, 7535, 7554, and 7862, with the C peak slightly exceeding the T peak. This confirms the heterogeneous methylation of HPV-16 molecules in CaSki and the fortuitous selection of an excess of unmethylated molecules in Fig. 1.

Different CpGs are altered with different frequencies. Fig. 2 depicts the methylation/lack of methylation for each of the 8,885 CpG sites evaluated in this study. Altogether, we found 1,292 methylated CpGs, i.e. 14.5% of all CpGs were methylated. Fig. 3 shows the relative frequency of methylation of the 19 sites. Approximately half (51 out of 115) of the specimens could not be amplified between 7091 and 7461. Thus, for this region, the reduced size of our sample may have limited our power to detect statistically significant relationships across sites and across diagnostic outcome groups. Nonetheless, these data point to systematic differences of probabilities of each site to become methylated. For example, 29 to 41% of the CpGs at the positions 7091, 7136, and 7145 were methylated (the only CpGs within a gene, the late gene, L1), while methylation was only around 10% for most other sites. There are three regions where methylation frequencies reached minima, namely the positions 7270, 7554, and, most pronounced, with a frequency of only 3%, position 7862. Remarkably, these three regions coincide with the same three unmethylated positions detected in the LCR of HPV-16 genomes in CaSki cells.

For a subset of these samples, we performed control experiments and directly sequenced the amplification product after bisulfite sequencing. All of these controls confirmed that the individual DNA molecules that were sequenced after plasmid cloning correlated with the ratios that existed in situ: Whenever we found hypomethylated or unmethylated clones, we also observed hypomethylation by direct sequencing, and hypermethylated clones correlated with highly methylated directly sequenced DNA. While it is obvious

that five samples represent a complex mixture of molecules with a low statistical power, they are nevertheless a good representation of the diversity in situ.

Correlation of CpG DNA methylation patterns with pathology of the infected cell population. The bar diagram shown in Fig. 4 separates the methylation frequencies in Fig. 3 by diagnostic outcome and visualizes CpG methylation in relation to the pathological status of the HPV-16 infection, i.e. asymptomatic infections (NIL, grey bars), CIN lesions (black), and carcinomas (white). For cancer specimens, the proportion that showed methylation of CpGs was 4% at 7862 and ranged between 12% and 53% for the remaining CpG sites (white bars). The proportion of all CpGs that were methylated was significantly greater than zero (i.e., for CpG sites 7091–7695 and 31–58: using Student's t Test, $p < 0.0001$). An exception was position 7862, where methylation occurred between 2 and 4% of test specimens, and we found no difference between CINs and NILs nor carcinomas and NILs (i.e. using Fischer's Exact Test, $p = 1.0$ and $p = 0.6$, respectively). CIN lesions (black bars) showed the lowest methylation frequency of the specimens tested, and methylation frequencies were more often intermediate in asymptomatic patients (grey bars). For example, for CIN specimens, we were able to detect methylation frequently at position 7145 (i.e. 33%, using Student's t Test, $p < 0.0001$). At all other sites, the frequency ranged from 0 to 17% but none proved to be statistically significant. However, for specimens acquired from asymptotically infected women, methylation frequencies greater than zero were detected at most CpGs (i.e. positions 7091, 7136, 7428, 7434, 7535 to 7695 and 31–43 and position 58, ranging from 6% at 37 to 33% at 7091, using Student's t Tests, $p < 0.0001$).

For carcinomas, 42% of specimens showed methylation at CpG sites 7136 and 7145. In comparison, only 13% and 9% of sites at 7136 and 7145 were methylated in specimens from asymptotically infected women (i.e., for each comparison, using Fisher's Exact Test, $p < 0.00002$). Additionally, at site 7145, 33% of CIN specimens showed methylation compared to 9% of specimens from asymptotically infected women (similarly, $p = 0.0005$). Last, when compared to specimens from asymptotically infected women, methylation in cancer samples was significantly elevated at CpG positions 31, 37, 52 and

58 (using Fisher's Exact Test, for 31: 17% vs 6%, $p < 0.0004$; for 37: 17% vs 6%, for 52: 18% vs 4% and for 58: 18% vs 7%, and for each comparison, $p < 0.0001$; for 43: 17% vs 7%, $p < 0.002$).

The minima at the positions 7270 and 7535/7554 are pronounced in all three groups, while the minimum at position 7862 is only clear for carcinomas and asymptomatic patients. We found no statistically significant difference in the methylation frequencies for these sites between carcinomas, CINs, and specimens from asymptotically infected women using Fisher's Exact Test. Methylation at 7862 is also low in the case of CIN lesions, but it does not form a dip, as there is a nearly complete lack of methylation in all promoter positions 3' of 7862, and we found no statistically greater frequency of methylation at this site when pathology groups were compared. Thus, in nearly all positions, methylation is highest in carcinoma lesions (white bars) and lowest among CIN lesions (black bars).

MeCpA and meCpT dinucleotides identify de novo methylation of HPV-16 DNA in cervical epithelia. In the methylated state of the palindromic sequence CpG the cytosine residues of the upper and the lower strand are normally both methylated. The two replication products of a meCpG containing DNA are hemimethylated, and methylation of the unmethylated cytosine is restored by the maintenance DNA methylase DNMT1. Toward de novo methylation (44a, 47a), DNMT3a and DNMT3b are considered responsible to target unmethylated cytosine residues, while their contributions to maintenance methylation have recently been demonstrated (5,14,20). While this occurs preferentially at CpGs, changes at CpA and CpT dinucleotides can occur as well, although with less efficiency than CpGs (14,30). CpC methylation is known to be very rare. The methylation state of meCpAs and meCpTs is not maintained during replication, as one of the replication products does not carry a record of the methylation, and the other strand is becoming diluted in multiple rounds of replication. As a consequence, the detection of meCpA and meCpT residues is proof that the sequenced DNA molecule or one of the immediate precursors had become methylated, and it does not constitute a record of a long term maintenance of methylation. A record of these three methylated

dinucleotides in HPV-16 genomes therefore amounts to a documentation of active de novo methylation in the cell populations carrying these HPV-16 genomes.

Toward measuring CpA, CpT and CpC methylation, we investigated the same nucleotide sequence output of all 115 samples in quintuplets, that had led to the data in Fig. 2. We detected 58 meCpAs and 49 meCpTs residues, among a total of 26,785 and 20,845, respectively, and no meCpC dinucleotide at all. We also found six additional meCpGs in CpG positions diverging from the HPV-16 reference sequence, apparently genomic variants of HPV-16 (10). The total number of meCpAs and meCpTs in the 115 samples is incomplete, however, since the three amplicons, originally designed only to detect CpGs, do not overlap in genomic regions that did not contain CpGs and were therefore excluded from the original strategy.

Fig. 5 maps the distribution of meCpAs and meCpTs within the three amplicons across the L1-LCR segment. The numbers along the x-axis of this figure indicate the genomic positions (24) of cytosine residues that are part of a CpA or CpT dinucleotide, while the y-axis represents the frequency of finding a methylated C at this position. The raw data that led to this figure can be obtained upon request, as a representation in form of a figure or a table would be unwieldy and uninformative to most readers. Inspection of Fig. 5 suggests clusters of these two methylated dinucleotides between the positions 7268-7327 and 7840-24. These two regions overlap with minima of CpG methylation and may suggest that de novo methylation is more efficient in nucleosomal linkers than in the nucleosomes. Our analyses suggested methylation was detectable frequently at positions 7268 and 7317, and less frequently at positions 7840, 7857, 7876, 7882, 7886, 7903, 2, 13, 73, and 77 (i.e., testing the hypothesis that the mean frequency of cytosine methylation was greater than the null, using Student's t-test, $p=0.0015$, $p=0.0045$, $p=0.0015$, $p=0.0046$, $p=0.0015$, $p=0.0009$, $p<0.0001$, $p=0.0009$, $p=0.0046$, $p=0.0003$, $p=0.0026$ and $p=0.0046$, respectively). Also, statistically we detected less precisely cytosine methylation at dinucleotide positions 7301, 7327, 7554, 7602, 7689, 7829, 7829, 7841 to 7845, 7874, and at position 5 (i.e., $p=0.01$ for each). Thus, using the most

stringent level of significance, our analyses detected methylation at the maxima at positions 7886 and at position 13.

Although sparse, when data were stratified by pathology outcomes, our analyses suggested that methylation at particular positions was detectable with statistical significance. For women with CIN, CpA was methylated at position 7268 (i.e., $p=0.0038$). For women evidencing NIL, these analyses suggested that CpT was methylated at position 7840 and CpAs were methylated at positions 7857, 7876, 7882 and 7886 (i.e., $p=0.014$, $p=0.014$, $p=0.0079$, $p=0.014$, $p=0.0014$, respectively). For women with carcinomas, we were unable to precisely detect nucleotide regions where cytosines were methylated on CpA and CpT.

DISCUSSION.

HPV-16 CpG methylation: preferred and protected sites. We have reported a detailed methylation study of a 913 bp segment of the genome of HPV-16 encompassing part of the L1 gene and the complete LCR in the cell line CaSki and 115 patient samples.

Altogether, we investigated the frequencies of methylation and position of CpGs among a total of 9,090 potential target sites (the sum of the clinical samples and CaSki clones).

Our data confirm that HPV-16 genomes are efficiently targeted by the epithelial CpG methylation machinery, raise questions as to the mechanism of this reaction and the biological consequences for the epithelial cell and/or the HPV-16 life cycle.

We did not detect an HPV-16 L1-LCR segment that was completely methylated. A past study, involving one of us (2), observed among 15 clinical samples five that seemed to be completely methylated in this segment, but our present data are more representative of HPV-16 genomes in situ, as the past findings were based on a shorter segment and on direct sequencing, which may have scored mixtures of HPV-16 DNAs that were methylated or unmethylated in the same CpG position as completely methylated.

We measured a lot of “noise” in HPV-16 DNA methylation, i.e. there are no sites that are always or never methylated nor are there conserved stretches of contiguous CpG methylation in the majority of molecules. Methylation does not appear very often at isolated CpGs, but frequently on three to eight or even more flanking CpGs, reminiscent of spread of the modification along a DNA. In spite of these reservations, we observed decreased methylation in three regions, the sites 7270 and 7862, and to a lesser degree the flanking sites 7535 and 7554. It is noteworthy to interpret these positions in the context of known cis-responsive elements and chromatin structures of the HPV-16 LCR. The segment 3’ to position 7862, which is often heavily methylated, contains all promoter elements, i.e. the promoter activator Sp1, whose binding is not influenced by DNA methylation (17), the viral factor E2, which is displaced by methylation, and the TATA box. This segment is organized in form of a specifically positioned nucleosome, whose acetylation affects the promoter (38). Position 7862 is located 5’ of this nucleosome and coincides with the viral replication origin and a silencer regulated by YY1 and CDP, and the 3’ flank of the viral enhancer, activated by AP-1. This region serves as a super-regulator, as YY1 and CDP with their associated HDAC activities and AP-1 with a histone acetylase activity repress and activate HPV transcription in different epithelial layers by influencing the promoter nucleosome and a second nucleosome encompassing the viral enhancer (1,3,26). Methylation and demethylation of the CpG at position 7862 may add another layer of crosstalk to this regulatory region. In addition, position 7862 is part of an E2 binding site that activates HPV replication, and has to remain demethylated to permit another round of replication. DNA methylated at position 7862 would be replication incompetent and eliminated. The fact that position 7862 is close to an Sp1 site conserved among HPVs (43), one is reminded of the ability of Sp1 to suppress methylation from some adjacent CpG elements (7). The properties of this DNA segment may establish a molecular basis for the poorly defined state of “latency” of HPV infections, i.e. presence of HPV DNA in the absence of symptoms, as repression of the enhancer and promoter and accessibility of the replication origin could lead to maintenance replication of the virus without expression of transformation functions.

The enhancer is covered by a second nucleosomes (Fig. 1) and 5' of the enhancer, we found a nucleosomal linker (39), which includes the positions 7535 and 7554. DNase I sensitivity studies suggested additional specifically positioned nucleosomes 5' of this region, which were separated by another linker around position 7270. These arguments would lead to a proposal that HPV-16 DNA tends to be hypermethylated in nucleosomally organized segments, and undermethylated in nucleosomal linkers, which sounds counterintuitive, but may have functional significance, since nucleosomally incorporated DNA is not protected from but rather still efficiently targeted by CpG maintenance methylation (28). The overlap of specifically positioned nucleosomes with hypermethylated regions is indicated in Fig. 1.

MeCpA and meCpT residues point to de novo methylation in epithelial cells, and our observations confirm that HPV genomes are efficiently targeted in undifferentiated cells in cell culture. While we measured only a total rate of about 0.4% of methylation of these two dinucleotides, the real frequency of de novo methylation is likely much higher, since our approach scored CpGs only in the "maintenance methylation data set" (Fig. 3), but not in the "de novo methylation data set" (Fig. 5), although CpGs are more efficiently methylated de novo than the other two dinucleotides. The occurrence of de novo methylation in a somatic tissue is little studied (44a, 47a) in contrast to embryos and cancer cells (19,32), but not completely surprising, as DNMT3a and b activities have[®] been detected in a variety of normal somatic cells. Strangely, meCpAs, and meCpTs appeared to occur frequently in regions of CpG undermethylation, and we speculate that maintenance methylation is particularly efficient within nucleosomes, and de novo methylation in nucleosomal linkers. While this latter observation is not statistically significant for most sites based on our data set, it is of interest that 14 out of 22 meCpA and meCpT residues observed by Kim and coll. (22) in cell cultures containing HPV-16 occurred in the nucleosomal linkers flanking the positions 7535/7554 and 7862.

Correlations between HPV-16 DNA methylation and pathology. We found methylation of HPV-16 DNA in three different clinical contexts, (i) in asymptomatic

infections (NIL), (ii) in low and high grade CIN, and (iii) in carcinoma, although with differing frequencies.

The methylation of presumably episomal HPV DNA in asymptomatic patients is surprising. We are not aware of a molecular scenario that would be comparable to the persistent maintenance of HPV in asymptomatic infections with the exception of the methylation of a CpG island in the EBNA promoters of Epstein-Barr-Virus. While this alteration occurs in asymptomatic B-cells as well as during carcinogenic progression, it was interpreted to support the tumorigenic process by suppressing of EBNA antigens (33). It is an open question whether our data point to an epithelial defense mechanism against heterologous DNA, or a viral adaption to be maintained in an epithelium without causing a neoplasia. As argued above, we propose that access to the viral replication origin with concomitant suppression of transcription may be an adaption to latency, a molecular state and scientific term, which is not yet formally recognized for HPVs as it is for herpes viruses. Kim and coll. (22) reported an excess of methylated HPV-16 genomes in undifferentiated cells in culture, and a stable relationship between methylated HPV genomes and maintenance of the undifferentiated state may be an embodiment of latency.

The low methylation levels of HPV genomes in CIN lesions, where HPVs replicate normally episomally, may stem from the expansion of the transcriptionally active cell population as expected from the initiation of the neoplastic process together and an increase of the virus genomes (37). This observation can probably be best compared with the transcriptionally highly active productive life cycle of polyoma- and adenoviruses.

The heavy methylation in cancers can be interpreted as confirmation of the "genome defense hypothesis" based on the frequent methylation of chromosomally integrated retroviruses, transgenes (4) and transfected adenovirus genomes and their chromosomal targets (15,41). It is generally known that HPV-16 occurs in carcinomas most often in the chromosomally integrated state (12,36). This does not mean that carcinomas do not contain transcriptionally active HPV genomes, since the example of the cell line CaSki (2) shows that carcinomas often contain HPV genomes in integrated tandem arrays which

are efficient methylation targets, while some of these genomes remain unmethylated and therefore actively expressing the HPV oncogenes (2,45). We caution to hope that methylation inhibitors, resulting in demethylation and therefore activation of repressed tumor suppressor genes, are beneficial for all kinds of carcinomas, as they would actually be tumor promoter in HPV activated lesions (18). While the increased methylation of the L1 gene in our samples may point to a role of methylation in the early-late switch, one may also consider that exonic CpGs have a higher propensity of becoming methylated and may be nuclei from where CpG methylation may spread to promoter regions (25).

Our database leads to hypotheses that we will study experimentally. It is obvious to address the question of whether HPV DNA in capsids is methylated, and if not, by what kinetics it establishes methylation after infection of raft cultures. In preliminary studies of HPV-11, we did not find any methylated HPV-11 genomes in viral particles, but a significant fraction of methylated HPV-11 DNA in newly infected human transplants (3a). In raft cultures with episomal HPVs, one can study the establishment of methylation patterns after integration into the chromosomal DNA. Laser capture microdissection may allow to localize the correlation of methylation patterns with histological sites and pathological features and to analyze by quantitative RNA studies correlations between transcription and methylation patterns. These considerations and our observation that HPV methylation is taxonomically widespread suggest HPV methylation a rich system for basic as well as clinical research approaches.

ACKNOWLEDGEMENTS.

This research was supported by NIH grant ROI CA-91964 and by funds from the Chao Family Comprehensive Cancer Center of the University of California Irvine to H.U.B., by a postdoctoral fellowship of the Cancer Center of the University of California Irvine to M.K., as well as by a Collaborative Research Grant from UC MEXUS-CONACYT to I.E.C.M, H.A.B.S, and H.U.B. We would also like to acknowledge technical support by John Huh and the services provided by Hanne Skomedal, tor Molden, and Irene Kraus of Norchip, Norway in the typing of HPV in cervical cancers.

REFERENCES.

1. Ai, W., Toussaint, E., and A. Roman. 1991. CCAAT displacement protein binds to and negatively regulates human papillomavirus type 6 E6, E7, and E1 promoters. *J. Virol.* 73: 4220-4229.
- 1a. Badal, S., Badal, V., Calleja-Macias, I.E., Kalantari, M., Chuang, L.S.H., Li, B.F.L., Bernard, H.U. The human papillomavirus-18 genome is efficiently targeted by cellular DNA methylation. *Virology* 324: 483-492 (2004).
2. Badal, V., Chuang, L.S.H., Badal, S., Tang, E., Villa, Wheeler, C.M., L.L., Li, B.F.L., and H.U. Bernard. 2003. CpG methylation of human papillomavirus-16 DNA in cervical cancer cell lines and in clinical specimens: genomic hypomethylation correlates with carcinogenic progression. *J. Virol.*, 77: 6227-6234.
3. Bernard, H.U. 2002. Gene Expression of Genital Human Papillomaviruses and Potential Antiviral Approaches. *Antiviral Therapy* 7: 219-237.
- 3a. Bernard, H.U., Christensen, N., and M. Kalantari, unpubl.
4. Bestor, T.H. and B. Tycko. 1996. Creation of genomic methylation patterns. *Nat. Genet.* 12:363-367.
5. Bird, A. P. 1992. The essentials of DNA methylation. *Cell* 70: 5-8.
6. Bosch, F.X., Manos, M.M., Munoz, N., Sherman, M., Jansen, A.M., Peto, J., Schiffman, M.H., Moreno, V., Kurman, R., and K.V. Shah. 1995. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J. Natl. Cancer Inst.* 87:796-802.
7. Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., and H. Cedar. 1994. Spl elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371: 435-438.
8. Burgers, W.A., Fuks, F., and T. Kouzarides. 2002. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends in Genetics* 18: 275-277.
9. Burnett, T.S., and J.P. Sleeman. 1984. Uneven distribution of methylation sites within the human papillomavirus 1a genome: possible relevance to viral gene expression. *Nucleic Acids Res.* 12: 8847-8860.
10. Calleja-Macias, I.E., Kalantari, M., Huh, J., Ortiz-Lopez, R., Rojas-Martinez, A., Gonzalez-Guerrero, J.F., Williamson, A.L., Hagmar, B., Wiley, D.J., Villarreal, L., Bernard, H.U., and H.A. Barrera-Saldana. 2004. High prevalence of specific variants of human papillomavirus-16, 18, 31, and 35 in a Mexican population. *Virology*, 319: 315-323.
11. Chan, W.K., Klock, G., and H.U. Bernard. 1989. Progesterone and glucocorticoid response elements occur in the long control regions of several human papillomaviruses involved in anogenital neoplasia. *J. Virol.* 63:3261-3269.

12. Daniel, B., Mukherjee, G., Seshadri, L., Vallikad, E., and S. Krishna. 1995. Changes in the physical state and expression of human papillomavirus type 16 in the progression of cervical intraepithelial neoplasia lesions analysed by PCR. *J. Gen. Virol.* 76:2589-2593.
13. Danos, O., Katinka, M., and M. Yaniv. 1980. Molecular cloning, refined physical map and heterogeneity of methylation sites of papilloma virus type 1a DNA. *Eur. J. Biochem.* 109:457-461.
14. Dodge, J.E., Ramsahoye, B.H., Wo, Z.G., Okano, M., and E. Li. 2002. De novo methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene* 289:41-48.
15. Doerfler, W., Remus, R., Muller, K., Heller, H., Hohlweg, U., and R. Schubert. 2001. The fate of foreign DNA in mammalian cells and organisms. *Dev. Biol. (Basel)*. 106:89-97.
16. Frommer, M., McDonald, L.E., Millar, D.S., Collis, C.M., Watt, F., Grigg, G.W., Molloy, P.L., and C.L Paul. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 89: 1827-1831.
17. Harrington, M.A., Jones, P.A., Imagawa, M., and M. Karin. 1988. Cytosine methylation does not affect binding of transcription factor Sp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2066-2070.
18. Herman, J.G., and S.B. Baylin. 2000. Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. In: Jones, P.A. and Vogt, P.K. (eds.) *DNA methylation and cancer*. Springer, Berlin, pp.35-54.
19. Jaenisch, R., and A. Bird. 2003. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Gen.* 33:245-254.
20. Jones, P.A. 2003. Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 983:213-219.
21. Jones, P.L., Wade, P.A., and A. P. Wolffe. 2001. Purification of the MeCP2/Histone[®] Deacetylase Complex from *Xenopus laevis*. *Methods Mol. Biol.* 181:297-307.
22. Kim, K., Garner-Hamrick, P.A., Fisher, C., Lee, D., and P.F. Lambert. 2003. Methylation patterns of papillomavirus DNA, its influence on E2 function, and implications in viral infection. *J. Virol.* 77:12450-12459.
23. Liang, G., Chan, M.F., Tomigahara, Y., Tsai, Y.C., Gonzales, F.A., Li, E., Laird, P.W., and P. A. Jones. 2002. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol. Cell. Biol.* 22:480-491.
24. Myers, G., Bernard, H. U., Delius, H., Favre, M., Iconogle, J, van Ranst, M., and C. Wheeler, C. (eds.). *Human papillomaviruses 1994 Compendium* pp. 1-A-3 to 1-A-8. Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, New Mexico, USA.
25. Nguyen, C., Liang, G., Nguyen, T.T., Tsao-Wci, D., Groshen, S., Lubbert, M., Zhou, J.H., Benedict, W.F., and P.A Jones. 2001. Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 93:1465-1472.

26. O'Connor, M.J., Stünkel, W., Koh, C.H., Zimmermann, H., and H.U. Bernard. 2000. The differentiation-specific factor CDP/Cut represses transcription and replication of Human papillomaviruses. *J. Virol.* 74: 401-410.
27. Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and E. Li. 1999. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99:247-257.
28. Okiwaki, M., and A. Verreault. 2004. Maintenance DNA methylation of nucleosome core particles. *J. Biol. Chem* 279:2904-2912.
29. Pater, M.M., Hughes, G.A., Hyslop, D.E., Nakshatri, H., and A. Pater. 1988. Glucocorticoid-dependent oncogenic transformation by type 16 but not type 11 human papilloma virus DNA. *Nature* 335:832-825.
30. Ramsahoye, B.H., Binizskiewicz, D., Lyko, F., Clark, V., Bird, A.P., and R. Jaenisch. 2000. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97:5237-5242.
31. Rhee, I., Bachman, K.E., Park, B.H., Jair, K.W., Yen, R.W., Schuebel, K.E., Cui, H., Feinberg, A.P., Lengauer, C., Kinzler, K.W., Baylin, S.B., and B. Vogelstein. 2002. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416:552-556.
32. Robertson, K.D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F.A., and P. A. Jones. 1999. The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res.* 27:2291-2298.
33. Robertson, K.D. 2000. The role of DNA methylation in modulating Epstein-Barr Virus gene expression. In: *DNA methylation and cancer*. Jones, P.A. and P.K. Vogt (eds.). p. 21-34. Springer Verlag Berlin.
-
34. Rost, F., Arab, A., Kleveriz, B., and H. zur Hausen. 1993. The effect of DNA methylation on gene regulation of human papillomaviruses. *J. Gen. Virol.* 74: 791-801.
35. Schiffman, M.H., and L. A. Brinton. 1995. The epidemiology of cervical carcinogenesis. *Cancer* 76: 1888-1901.
36. Schwarz, E., Freese, U.K., Gissmann, L., Mayer, W., Roggenbuck, B., Stremlau, A., and H. zur Hausen. 1985. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 314:111-114.
37. Stoler, M.H., Rhodes, C.R., Whitbeck, A., Wolinsky, S.M., Chow, L.T, and T.R. Broker. 1992. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol.* 23:117-128.
38. Stünkel, W., Huang, Z., Tan, S.H., O'Connor, M, and H.U. Bernard. 2000. Nuclear matrix attachment regions of human papillomavirus-16 repress or activate the E6 promoter depending on the physical state of the viral DNA. *J. Virol.* 74:2489-2501.
39. Stünkel, W., and H.U. Bernard. 1999. The chromatin structure of the long control region of human papillomavirus type 16 represses viral oncoprotein expression. *J. Virol.* 73: 1918-1930.

40. Sugawara, K., Fujinaga, K., Yamashita, T., and Y. Ito. 1983. Integration and methylation of Shope papilloma virus DNA in the transplantable Vx2 and Vx7 rabbit carcinomas. *Virology* 131:88-99.
41. Sutter, D., and W. Doerfler. 1980. Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:253-256.
42. Tan, S.H., Baker, C.C., Stünkel, W., and H.U. Bernard. 2003. A transcriptional initiator overlaps with a conserved YY1 site in the long control region of human papillomavirus type 16. *Virology*, 305:486-501.
43. Tan, S.H., Leong, L. E.C., Walker, P.A., and H.U. Bernard. 1994. The human papillomavirus type 16 transcription factor E2 binds with low cooperativity to two flanking binding sites and represses the E6 promoter through displacement of Sp1 and TFIIID. *J. Virol.* 68:6411-6420.
44. Thain, A., Jenkins, O., Clarke, A.R., and K. Gaston. 1996. CpG methylation directly inhibits binding of the human papillomavirus type 16 E2 protein to specific DNA sequences. *J. Virol.* 70:7233-7235.
- 44a. Toth, M., Muller, U., and W. Doerfler. 1990. Establishment of de novo DNA methylation patterns. Transcription factor binding and deoxycytidine methylation at CpG and non-CpG sequences in an integrated adenovirus promoter. *J. Mol. Biol.* 214:673-683.
45. Van Tine, B.A., Knops, J., Broker, T.R., Chow, L.T., and P. T. Moen. 2001. In situ analysis of the transcriptional activity of integrated viral DNA using tyramide-FISH. *Dev Biol (Basel)*106:381-385.
46. Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., and N. Munoz. 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* 189:12-19.
47. Wettstein, F.O., and J.G. Stevens. 1983. Shope papilloma virus DNA is extensively methylated in non-virus-producing neoplasms. *Virology* 126:493-504.
- 47a. Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Jefferson, S., and W.P. Diver. 1988. Methylation at dinucleotides other than CpG: implications for human maintenance methylation. *Gene* 74:151-152.
48. Yoder, J.A., Walsh, C. P., and T.H. Bestor. 1997. Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Gen.* 13: 335-340.
49. zur Hausen, H. 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat. Rev. Cancer* 2: 342-350.

LEGENDS TO FIGURES.

Fig. 1. Heterogeneity of CpG methylation in HPV-16 genomes derived from CaSki cells. Each vertical set of rectangles represents one of 19 specific CpG dinucleotides, the

number on the top of the bar the position of this CpG in the genome of HPV-16. Each horizontal set of rectangles represents a 913 bp segment of the HPV-16 genome, covering the 3' end of the L1 gene and the complete long control region. Unmethylated CpGs are indicated by white rectangles, methylated by black ones. The two vertical white separators indicate the borders between amplicons, and discontinuities between supposedly different HPV-16 molecules. The upper part of the figure represents three specifically positioned nucleosomes (39), which may overlap with regions of hypermethylation.

Fig. 2. Heterogeneity of CpG methylation in HPV-16 genomes derived from clinical specimens. The figure visualizes the methylation of 19 CpG dinucleotides in the HPV-16 genomes of five independent clones each derived from one of 115 clinical samples, a data base of the methylation status of 8,885 CpG dinucleotides. A: asymptomatic patients; B: CIN; C: cervical cancer. White horizontal rectangles represent an unmethylated CpG, black rectangles meCpGs. Each quintuplet of horizontal lines represents clones derived from one patient. A horizontal line does not indicate a contiguous 913 bp amplicon, but is derived from three different HPV-16 genomes, as indicated by two white vertical bars. These discontinuities were a technical necessity, since the destruction of bisulfite modified DNA did not allow us to generate the analyzed 913 bp fragment in one contiguous amplicon. White indents in this figure identify clones that could be only partially analyzed due to the low amount of sample DNA. Due to the compression of this figure, Mexican, Norwegian and U.S. samples could not be visually distinguished. The Mexican cohort contained 70% genomic AA variants and only 30% E variants (10), while all Norwegian and U.S. samples were E variants. We could not detect any obvious distinction between the methylation patterns of these cohorts and variants.

Fig. 3. Methylation frequencies of 19 CpG nucleotides in the HPV-16 genomes of five independent clones each derived from one of 115 clinical samples. For the overlap of the genomic positions with the L1 gene, 5'LCR, enhancer and promoter, see Fig. 1.

Fig. 4. Methylation frequencies of 19 CpG nucleotides in the HPV-16 genomes of five independent clones each derived from one of 115 clinical samples separated by pathological properties. Grey bars: Asymptomatic patients (no identifiable lesion, NIL); black bars: low and high grade CIN; white bars: cervical cancer.

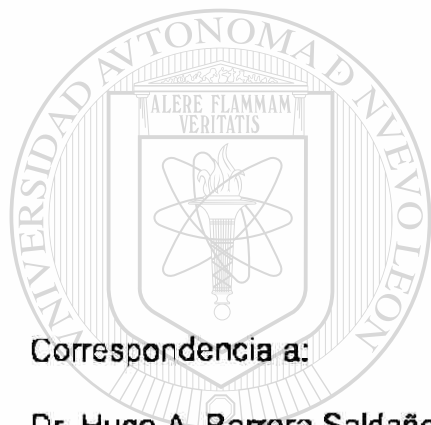
Fig. 5. Methylation frequencies of CpA and CpT nucleotides in the HPV-16 genomes of five independent clones each derived from one of 115 clinical samples. The figure represents 107 meCpA and meCpT dinucleotides in the same genomic segment that was studied for CpG methylation. The numbers along the x-axis of this figure indicate the positions of cytosine residues that are part of a CpA or CpT dinucleotide as verifiable by comparison with the complete genomic sequence of HPV-16 (24), while the y-axis represents the frequency of finding a methylated C at this position.

"VARIANTES DEL PAPILOMAVIRUS HUMANO Y DESARROLLO DEL CÁNCER DE CÉRVIX"

Calleja-Macias Itzel E.^{1,2}, Ortiz-López Rocio¹, Rojas-Martínez Augusto¹, Bernard
Hans U.² y Barrera-Saldaña H. A¹.

¹ Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética (ULIEG)
Departamento de Bioquímica, de la Facultad de Medicina, de la Universidad
Autónoma de Nuevo León. Monterrey, N.L. 64460. México.

² Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de California
Irvine, California 92697. USA



Correspondencia a:

Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

Departamento de Bioquímica.

Facultad de Medicina de la UANL. Madero y Aguirre Pequeño Col. Mitras
Centro. C.P. 64460 Monterrey, N. L. México.

Teléfono: (818) 329-4173, Fax: (818) 333-7747, E-mail: hbarrera@fm.uanl.mx

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

Resumen

Los virus del papiloma humano (VPHs) desempeñan un papel central en la etiología del cáncer cervical. Dado que solamente una pequeña fracción de las neoplasias intraepiteliales cervicales (NICs) infectadas con VPHs de alto riesgo progresa a carcinoma cervical invasivo (CI), deben de existir otros factores implicados en el desarrollo de la neoplasia. Un factor importante que emerge es la variación genómica entre los diferentes tipos virales. Tal variación ha sido utilizada para estudiar la distribución geográfica de estos virus, pero cada día hay más evidencia de que ésta pudiera ser determinante para el desarrollo de la enfermedad neoplásica. Los datos obtenidos indican que diversas variantes del virus tienen características bioquímicas y biológicas alteradas y que representan un factor de riesgo adicional en el desarrollo de las NICs y de los tumores. Esto puede ser relevante no solamente para la biología de la infección con VPH y de su asociación con la neoplasia, sino también para la detección y tipificación del virus en la práctica clínica. Y más allá, en las estrategias para el desarrollo de tratamientos y el diseño de medidas profilácticas (vacunas).

Abstract

Human papillomaviruses (HPVs) play a central role in the etiology of cervical cancer. However, only a small proportion of cervical intraepithelial neoplasias (CIN) infected with high-risk HPVs will progress to invasive carcinoma (IC), there should exist additional factors involved in the development of neoplasia. An important emerging viral factor is naturally occurring genomic variation among different HPV types. Such variation has been used to study the geographical distribution of HPVs, but there is increasing evidence that it may be important in determining the risk of development of neoplastic disease. Collected data indicate that different HPV variants have altered biochemical and biological properties and represent an additional risk factor in the development of CIN and IC of the cervix. This may be relevant not only to the biology of HPV infection and its association with neoplasia, but also for the use of viral typing in clinical practice. and furthermore, in strategies for the development of treatments and the design of prophylactic measures (vaccines).

Palabras clave: VPH, variación genómica, cáncer cervical, subtipos

Keywords: HPV, genomic variation, cervical cancer, subtypes

requiere de otros factores además de la presencia del virus. La mayoría de las infecciones se resuelven espontáneamente en un cierto plazo [24] y solamente una pequeña proporción de NICs 1 y 2 progresará CC. El riesgo de progresión de NICs 3 a CI es de al menos el 12%, como ha sido demostrado por estudios de meta-análisis con seguimiento en un rango de 0.5 a 20 años [25][26].

Varios estudios epidemiológicos han identificado factores de riesgo adicionales involucrados en la progresión de NIC 1 a NIC 3 y CI [22][27][28]. Factores virales tales como la persistencia de la infección, la integración del DNA viral en el cromosoma celular del huésped, la expresión de los genes virales E6 y E7 en células replicándose, y la inactivación del gen E2 (debido a la integración viral o por mutación) están involucradas en el desarrollo y mantenimiento del fenotipo transformado; mientras que factores del huésped tales como el genotipo del HLA y polimorfismos en genes celulares, podrían también ser importantes [6][7][10][12][29-31].

Recientemente se ha sugerido que la variabilidad intratípica de los VPHs está también implicada en la transformación maligna [32][33]. Algunas variantes tienen propiedades biológicas y bioquímicas diferentes [34], consecuentemente, se ha asumido que podrían también diferir en patogenicidad. La observación de que ciertas variantes son más prevalentes en ciertas regiones geográficas no es sorprendente y podría ser explicada por el efecto "fundador", la co-evolución de los VPHs con las razas humanas o por los patrones de migración humana. Esto también podría reflejar un origen potencial para ciertos tipos de VPHs en ciertas regiones geográficas.

Los datos que han sido generados hasta la fecha acerca de las variantes y su participación en el desarrollo de la neoplasia cervical serán ahora discutidos.

Significancia funcional de la variación genómica intratípica.

La región del genoma del VPH requerida para la transformación ha sido mapeada entre el RLC y los genes virales E6 y E7 (ver figura 1) [35]. Las proteínas E6 y E7 interactúan con una amplia gama de proteínas celulares, aunque las mejor conocidas son p53 y pRb [36]. La transcripción de E6 y de E7 es controlada por el promotor y el potenciador en RLC y por la proteína E2. La RLC contiene varios sitios de unión a E2, además de los sitios de unión para varios factores de transcripción celulares [37]. Considerando lo anterior, se puede asumir que las variaciones nucleotídicas en RLC, E2, E6 y E7 pudieran tener repercusiones funcionales.

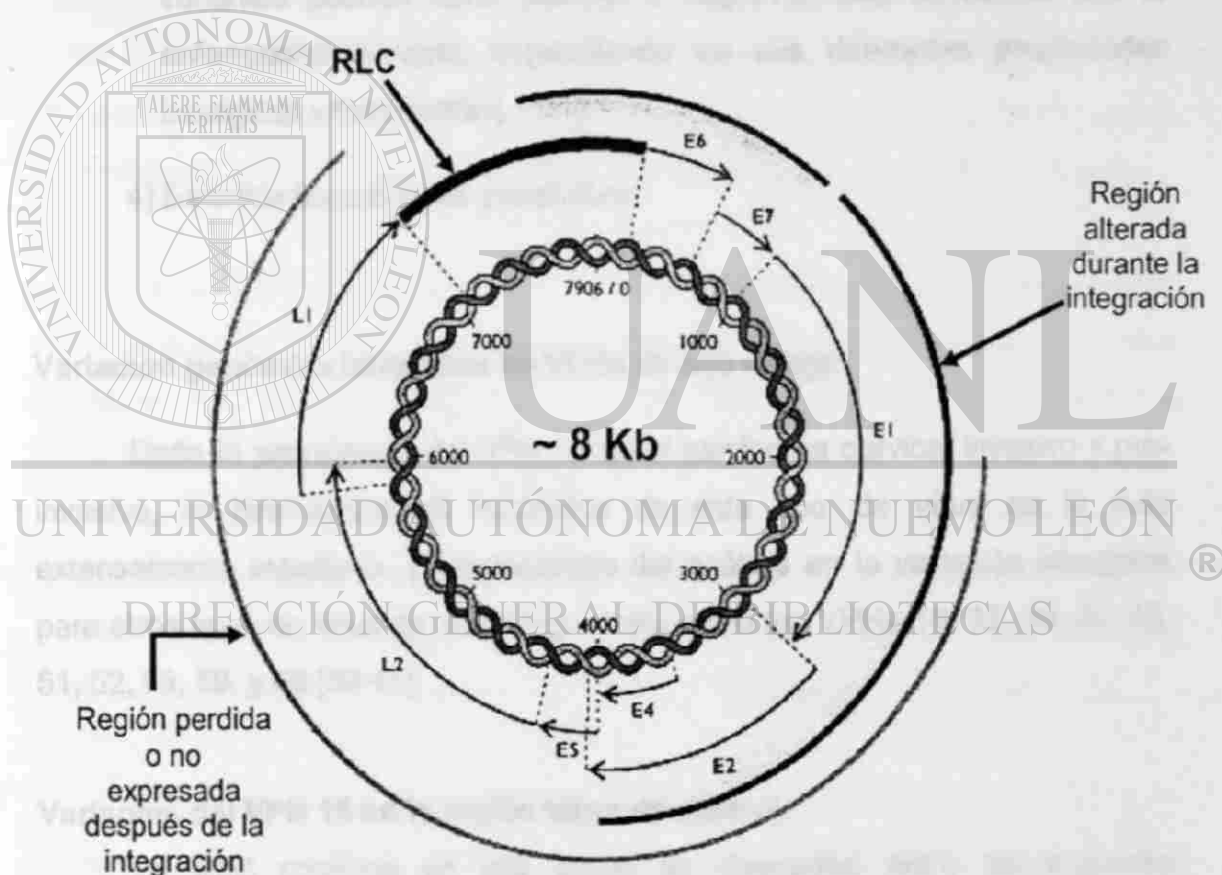


Figura 1. Modelo del genoma del VPH. El genoma de DNA de doble cadena de aproximadamente 8 Kb muestra las tres regiones básicas: a) La región larga de control (RLC), conteniendo secuencias críticas que regulan la transcripción y la replicación de genes tanto virales como celulares, b) Las regiones con marcos abiertos de lectura u ORFs (del inglés, open reading frames) de los genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7), las cuales codifican para la replicación y transformación celular, y c) Los ORFs de los genes tardíos, los cuales codifican para proteínas estructurales (L1 y L2) [38].

El análisis de la variabilidad genómica de los diferentes tipos de VPHs tiene muchos objetivos. Es importante tener una base de datos para:

- 1) El desarrollo de herramientas eficientes de diagnóstico y vacunas.
- 2) Aplicación en los estudios epidemiológicos en los cuales la variación en la secuencia puede ser usada como marcador para monitorear los VPHs en poblaciones definidas.
- 3) Estudios de relación entre genotipo y fenotipo (por ejemplo ciertas variantes pueden estar positiva o negativamente asociadas con la enfermedad cervical, dependiendo de sus diferentes propiedades biológicas y funcionales).
- 4) Estudios taxonómicos y evolutivos.

Variación genómica intratípica en VPHs de alto riesgo.

Dada la prevalencia del VPH 16 en el carcinoma cervical invasivo y pre-invasivo, la heterogeneidad intratípica de este tipo de virus es la más extensamente estudiada, en menoscabo del análisis en la variación intratípica® para otros tipos de virus de alto riesgo, tales como los VPHs 18, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, 59, y 68 [39-41].

Variantes del VPH 16 en la región larga de control.

La RLC contiene un alto grado de diversidad entre las muestras analizadas, alcanzado hasta un 5% y contrastando con la mayoría de los genes en otros organismos, para los cuales se observa menor al 2%. Analizando la RLC de una amplia colección de muestras cervicales positivas para VPH 16, Ho y cols. encontraron que la variación en la secuencia formaba cuatro diferentes ramas filogenéticas, a saber:

- i) Las variantes asiático-americanas (AA), las cuales son encontradas principalmente en Centro y Sudamérica así como en España.
- ii) Las variantes africanas (Af-1 y Af-2), encontradas en África.
- iii) Las variantes Asiáticas (As), encontradas en el sureste de Asia.
- iv) y Las variantes Europeas (E), encontradas en todas las regiones, excepto África.

Subsecuentes estudios completaron la clasificación de estas variantes a través del análisis de la variación en la secuencia de los genes E6, L1, L2 y de la RLC, agregando la variante Norteamericana-1 [42][43].

Diversos estudios han indicado que la persistencia viral y el desarrollo de lesiones de alto grado y del CI, están no solo directamente asociadas con la presencia del VPH 16, sino que también con las variantes específicas de éste.

La RLC contiene sitios de unión para la proteína viral reguladora de la transcripción E2 [44], así como para factores de transcripción celular, los cuales modulan su función positivamente (Ap1, Sp1, Nf1, Oct-1 y Tef-1) o negativamente (YY1) [45-46]. Los cambios nucleotídicos dentro de esta región reguladora pueden influir en la replicación y la transcripción, a través de un efecto en la unión de complejos de proteínas reguladoras con el DNA. Los cambios dentro de los sitios de unión a YY1, juegan un papel especial, pues tienen el potencial de aumentar la expresión de las oncoproteínas virales [47].

Se han aislado algunas variantes europeas de carcinomas cervicales que se caracterizan por tener mutaciones puntuales o deleciones en los sitios de unión de YY1 en la RLC. Comparaciones con la secuencia de referencia europea, revelan que estas variantes tienen aumentada su actividad transcripcional [48]. Este mismo grupo también identificó un sitio de unión a Sp1, el cual se traslapa con el sitio de unión de YY1 en las posiciones 7840-7848. Una mutación puntual dentro de este sitio mostró un incremento de 4.7 veces en la afinidad del promotor P97 por la unión del factor Sp1. Mientras que una

mutante, a la cual le fue eliminada el sitio de unión para Sp1 mostró solamente de 1 a 1.6 veces más aumentada la actividad del promotor. De estos datos se concluyó que la competencia entre Sp1 y YY1 para unirse al DNA juega un papel importante en la represión mediada por YY1 por la unión al sitio 7480-7848. En un estudio realizado en Corea, fueron identificados en muestras de CI que contenían formas episomales de VPH 16, tres mutaciones puntuales en los sitios de unión a YY1 en la RLC. Usando ensayos de transfección, las tres mutantes mostraron de 2 a 4 veces mayor actividad transcripcional que la del tipo silvestre. En contraste, las RLCs de VPHs integrados o episomales sin mutaciones en los sitios de unión a YY1, mostraron niveles similares a la actividad del promotor del prototipo, sugiriendo que las mutaciones en el sitio de unión a YY1 están funcionalmente relacionadas al desarrollo del CC causado por el VPH 16 episomal [49].

En otro estudio, fueron observadas actividades transcripcionales similares en todas las RLCs de todas las variantes E del VPH 16 examinadas [37]. Solamente una muestra AA mostró incrementada la actividad transcripcional casi 1.7 veces más, comparada con la clona de referencia (esta variante mostró cambios en el extremo 3' de la mitad de la RLC entre los nucleótidos 7660 y 7890). De estos datos se ha sugerido que las variantes AA podrían tener una actividad oncogénica aumentada en comparación con las variantes europeas. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Adicionalmente, aunque, las variantes AA tienen cambios nucleotídicos en dos de los tres elementos de respuesta a la progesterona/glucocorticoides (GREs), estos cambios no resultaron en un incremento en la actividad transcripcional. Aun así, se ha propuesto que la inducción por progesterona podría revelar diferencias funcionales adicionales entre las variantes E y otras del VPH 16 [37].

Variación en la región tardía río arriba del VPH 16.

Como se mencionó anteriormente, la transcripción de genes tempranos ha sido observada en células basales y en capas celulares suprabasales en epitelios normales infectados con VPH, así como también en las células de NICs y en células cancerosas [50-51]. En contraste, los genes virales tardíos L1 y L2 son expresados en la última etapa de la producción viral. El gen L1 codifica la proteína de la cápsida mayor y el gen L2 codifica para la proteína de la cápsida menor [52-54]. Las proteínas L1 y L2 juntas se ensamblan en una capa de proteína altamente estructurada que rodea al DNA genómico viral de las nuevas partículas virales completas que son secretadas fuera de las células y que contribuirán a la infección. Estas dos proteínas también sirven como antígenos del VPH 16 [55].

La transcripción de los genes tardíos está fuertemente asociada a los queratinocitos diferenciados cercanos a la superficie epitelial [50-53]. Sin embargo, los transcritos de estos genes tardíos también son detectados en capas suprabasales, pero permanecen en el núcleo [51]. La expresión de estos genes tardíos puede ser vista en NIC y CI, pero los niveles detectables de las proteínas L1 y L2 se encuentran más a menudo en las capas celulares que muestran una cierta diferenciación. La producción de las proteínas L1 y L2 en los casos positivos para VPH, se ha observado que se encuentra más elevada (hasta un 87%) en NICs de bajo grado; en forma moderada (29%) en NICs de alto grado, mientras que los niveles más bajos (19%) son reportados en CI [55]. Por lo tanto, es probable que la expresión de los genes tardíos del VPH 16 en queratinocitos no completamente diferenciados sea regulada por RNA viral, o elementos del DNA y/o por los factores celulares.

Los estudios recientes han proporcionado evidencia directa de la existencia de una región promotora localizada inmediatamente río arriba del ORF del gen L2 del VPH 16 [56-57]: la región tardía río arriba (referida como LUR, por sus siglas en inglés late upstream region). Esta región tiene una función en la regulación de la expresión de genes tardíos dependiente de

diferenciación y se encuentra entre el ORF del gen E5 y el ORF del gen L2, comprendiendo 138 pb. Geisen y Kahn identificaron un elemento de 78 pb como crítico para la actividad del promotor [57]. En un estudio de la variabilidad genómica en el LUR de 50 casos de NICs y CIs positivos para el VPH 16, los resultados demostraron que las variaciones en LUR son más frecuentes que en otras regiones del virus, así como que la frecuencia de la variación del LUR es más alta en el CI que en las muestras con NIC.

Variación intratípica en los genes del VPH 16.

Las proteínas E2, E4, E5, E6, y E7 de los VPHs son importantes por sus propiedades virales tales como: la replicación y la transcripción del DNA, la interacción con el citoesqueleto, la inmortalización y la transformación [58]. La variación en la secuencia de una o más de estas proteínas puede llevar a la alteración de su función biológica y a afectar así el resultado clínico de la infección. La caracterización de la variación en la secuencia nucleotídica dentro de los tipos de VPHs representa un enfoque racional a la identificación de las variantes, las cuales podrían alterar sus funciones biológicas.

Diversos estudios han examinado a los genes E2, E4, E5, E6 y E7 en muestras positivas de HPV 16 y han revelado una fuerte co-variación intergénica en su secuencia [59-61].

Variantes en E6 del HPV 16.

En un estudio en mujeres inglesas con anomalías citológicas cervicales de menor importancia, se identificó una variante asociada con persistencia viral y progresión a NIC 2 y a NIC 3. Esta variante tenía una base substituida en la región codificante de E6 en el nucleótido 350 (T350G), dando por resultado un cambio aminoácido de una leucina por una valina (L83V), y se encontraba presente en múltiples linajes virales, incluyendo a las variantes E y a

las AA [62]. Esta variante fue asociada más frecuentemente con CI que con NICs en una población sueca [63]. Sin embargo, en un estudio realizado por los mismos autores, en muestras VPH 16 positivas en mujeres italianas, el prototipo E6 estuvo igualmente distribuido entre NICs y CI, y la variante L83V no segregó con enfermedad de alto grado. En cambio, en esta última población, la variante L83V, cuando se encontraba sola, segregaba con NIC, pero no con CI, mientras que las multi-variantes de E6 fueron asociadas a CI [64]. La razón de que esta variante fuese asociada con CI y no con NICs en Suecia, fue debido no a las diferencias funcionales de la proteína E6, si no al hecho de que esta proteína viral en particular evade el reconocimiento inmune del hospedero [65].

En otro estudio con pacientes suecas se demostró que tanto las muestras con NICs, como con cáncer invasor, contenían la misma variante del VPH 16. Sin embargo, no se encontró asociación alguna entre la variante L83V y CI [66]. De la misma forma, en un estudio de los Países Bajos, no se encontró una asociación con L83V o con ninguna otra variante del E6 y del E7 del VPH 16 en seis lesiones progresando y 34 en un estado no progresivo a enfermedad [67]. Por otra parte, una distribución igual de las variantes del E6 del VPH 16, incluyendo la L83V, fue encontrada en pacientes alemanas con NICs y con CI, sugiriendo que la variación de la secuencia de E6 no es un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad en esta población [68]. Una distribución igual de la variante de L83V también fue identificada en estudios en el Reino Unido [69-71].

Las discrepancias en los resultados obtenidos en estos estudios pueden reflejar diferencias en el diseño del estudio o en el número de los pacientes examinados. Alternativamente, la oncogenicidad de la variante de L83V podría variar geográficamente, posiblemente debido a las diferencias genéticas entre las poblaciones.

Las diferencias en las actividades funcionales de variantes del gen E6 del VPH 16 ya han sido demostradas [34]. En particular, las diferencias se han identificado en la capacidad de las variantes del E6 de cooperar con la proteína de referencia E7 para la generación de colonias de queratinocitos humanos

resistentes a la diferenciación y a su blanco, la degradación de la proteína p53. Una de las variantes examinadas, la variante 512 (la cual ha sido clasificada como AA), excedió a la proteína de referencia E6 europea en su capacidad para bloquear la diferenciación de los queratinocitos en respuesta al suero y al calcio. En contraste, la variante z84 (clasificada como Af-2) demostró una reducida capacidad de cooperar con E7 en la formación de colonias de resistencia a la diferenciación de los queratinocitos humanos, cuando éstas fueron comparadas con la proteína E6 europea. También se ha observado que la variante Af-2 había reducido su capacidad de dirigir la degradación de p53, comparándola con la variante AA y la variante E de referencia. Por consiguiente, fue propuesto que las actividades biológicas de la proteína E6 del VPH 16, así como su capacidad de inducir la degradación de p53 *in vitro*, están directamente correlacionadas [34]. En otro estudio, fue divulgado que la variante E7 N29S del VPH 16 tenía dos veces más la capacidad de cooperar con la oncoproteína ras en la transformación de los fibroblastos de embrión de rata [72].

Variantes génicas en E7 del VPH 16

Varios grupos investigando diferentes poblaciones han estudiado la variación en la secuencia del gen E7 del VPH 16. Todos estos grupos sugieren que la secuencia prototipo del gen E7 del VPH 16 está altamente conservada [72][64][68][73].

Sin embargo, en un estudio coreano que investigaba las variantes del E7 del VPH 16 en tejidos normales, NIC 3 y CI, el prototipo fue detectado en solamente el 10% de carcinomas invasivos. La variante más común, N29S (A647G), estaba presente en el 70% de los carcinomas invasivos, indicando que la variación en E7 puede ser un factor de riesgo para la neoplasia cervical en la población coreana estudiada [74].

Variantes del gen E2 del HPV 16

La proteína E2 del HPV juega un papel esencial en la regulación de la transcripción y replicación viral. Esta contiene un dominio N-terminal de activación transcripcional conservado y una región C-terminal responsable para la dimerización y un sitio específico de unión al DNA [75]. Esta proteína tiene una doble función, pues dependiendo de su configuración, puede activar o reprimir la transcripción del promotor P97 [76]. La integración del DNA viral en el genoma celular lleva a la pérdida de la función de E2, lo cual juega un importante papel en la progresión carcinogénica [77].

La variación en la secuencia en la región E2 del VPH 16 ha sido también analizada [37] y se han encontrado diferencias menores en el potencial de transactivación en las variantes de E2. Además, la transcripción del promotor P97 se vió incrementada en al menos 1.5 veces para cada variante E2 del VPH 16, en comparación con la clona de referencia. Sin embargo, la actividad transcripcional de las variantes en E2 identificadas, difieren levemente.

En un estudio conducido en una población mexicana, las variantes AA del VPH 16 fueron detectadas con frecuencia en CC y estos aislados tenían extensos cambios nucleotídicos en el gen E2 [59]. Mientras que en un estudio reciente con muestras NIC 1 y NIC 3 de una población inglesa, la variante C3684A (T310K) del VPH 16 segregó con muestras NICs 3. En este mismo estudio, ni la variante de T310K, ni cualquier otra variante de E2 del VPH 16 mostró una segregación con la variante L83V del E6 del VPH 16 [71]. En otro estudio se examinó la variación de la secuencia E2 en lesiones NIC 3 y CI, descartándose cualquier correlación entre las variantes de E2, incluyendo T310K, y la presencia de la invasión [78]. Por lo tanto, esta variante puede ser importante en la progresión de NIC 1 para NIC 3, pero factores adicionales parecen ser requeridos para la progresión de NIC 3 al carcinoma cervical invasor.

Variantes del E2 en los HPVs 16 y 18.

En otro estudio, una variante E2 del VPH 18 con potencial oncogénico disminuido fue descrita en lesiones cervicales [79]. En otro estudio, en el cual se analizaron 34 lesiones VPH 16 y 29 positivas para VPH 18 con un amplio espectro histológico de neoplasias cervicales, no se encontró correlación alguna, ya sea entre las variantes del VPH 16 o las variantes del VPH 18, y el grado de lesión. Sin embargo, para VPH 16, las variantes de E2 co-segregaron con frecuencia con la variante L83V del VPH 16, la cual ha sido asociada con persistencia viral. Esta co-segregación fue propuesta como un factor de riesgo adicional para el desarrollo del CC [80].

Variantes en la región RLC del VPH 18

Investigando la variabilidad genética del VPH 18, un estudio detectó 19 mutaciones en la RLC, ocho de las cuales estaban presentes en los sitios de unión a los factores de transcripción [81]. En un estudio posterior, se determinó el significado funcional de dos de las mutaciones encontradas, correspondientes a los nucleótidos 40 y 41 (G40T y G41A) en el sitio Sp1 proximal al promotor de E6/E7 del VPH 18 [82]. La proteína Sp1 se une con alta afinidad al sitio de unión Sp1 mutante más que al del prototipo, y también se observó que la actividad del promotor fue incrementada de 2 a 3 veces más bajo el control de la RLC llevando la mutación G40T y de 4 a 5 veces más llevando la mutante G41A. En general, se ha sugerido que mutaciones puntuales en el sitio de unión a Sp1 dan lugar a una afinidad más alta de la proteína para unirse al DNA y a una actividad más fuerte del promotor de E6/E7.

Variación en la secuencia en los VPH de bajo riesgo

La variación intratípica del VPH en tipos menos prevalentes fue analizada en una colección mundial de especímenes y aportó información acerca de la relación evolutiva inter-tipo [83].

Los VPHs 6 y 11 raramente se encuentran en tumores invasivos. Heinzel y cols. examinaron la diversidad genómica de los VPHs 6 y 11 a partir de muestras de diversas partes del mundo y compararon las funciones del potenciador de las cinco variantes más divergentes. La prueba funcional de un segmento dentro del extremo 5' de la RLC y del potenciador específico del epitelio, indicó diferencias transcripcionales entre los VPHs referidos como 6a, 6b, y dos variantes del VPH 11, así como con la secuencia de referencia del VPH 11 [84-85]. Sin embargo, en otro estudio, la variación en la secuencia en la RLC de muestras positivas para VPH 6, no se encontraron actividades significativamente diferentes entre los promotores responsables de la expresión de las proteínas E6 y E7 [84]. En un estudio posterior, las proteínas E2 de los VPHs 6a y 6b tuvieron actividades transcripcionales idénticas y fueron indistinguibles en su capacidad para estimular la transcripción de un reportero bajo el control de un promotor dependiente de E2, en queratinocitos humanos primarios. De la misma manera, las proteínas E2 de ambas variantes tenían la misma capacidad de reprimir la transcripción *in vivo* [86].

Conclusión

Se han identificado muchas variaciones intratípicas en la secuencia del VPH, con características biológicas y bioquímicas alteradas y se ha sugerido que estas alteraciones afectan la patogenicidad de estas variantes. Sin embargo, los resultados de diversos estudios con respecto a variantes del VPH son contradictorios. La oncogenicidad de las variantes parece estar influenciada geográficamente y por el origen étnico de la población estudiada.

Los estudios aquí revisados proporcionan evidencia que hace pensar que la variación intratípica en la secuencia del VPH puede representar un factor de riesgo importante para el desarrollo de NICs y de CC. Sin embargo se necesitan estudios adicionales sobre las variaciones intratípicas de otros tipos de VPHs y de su papel en la etiología y alteraciones patológicas cervicales, para acabar de sustentar esta interesante hipótesis.

Bibliografia:

- [1] zur Hausen H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1288: 55-78.
- [2] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*. 1999; 189: 12-9.
- [3] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002; 55: 244-65.
- [4] zur Hausen H. Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 1991; 184: 9-13.
- [5] Syrjänen SM, Syrjänen KJ. New concepts on the role of human papillomavirus in cell cycle regulation. *Ann Med*. 1999; 31: 175-187.
- [6] Hawley-Nelson P, Vousden KH, Hubbert NL, Lowy DR, Schiller JT. HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalise human foreskin keratinocytes. *EMBO J* 1989; 8: 3905-3910.
- [7] Nead MA, McCance DJ. Activities of the transforming proteins of human papillomaviruses. In *Human Tumour Viruses*, McCance DJ (ed.). American Society for Microbiology: Washington, 1998; 225-251.
- [8] von Knebel Doeberitz M, Oltersdorf T, Schwarz E, Gissmann L. Correlation of modified human papillomavirus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res* 1988; 48: 3780-3786.
- [9] Turek LP, Smith EM. The genetic program of genital human papillomaviruses in infection and cancer. *Obstet Gynecol Clin N Am* 1996; 23: 735-758.
- [10] Romanczuk H, Howley PM. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalisation capacity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 3159-3163.
- [11] Kovelman R, Biliter GK, Glezer E, Tsou AY, Barbosa MS. Enhanced transcriptional activation by E2 proteins from the oncogenic human papillomaviruses. *J Virol* 1996; 70: 7549-7560.
- [12] Kalantari M, Karlsen F, Kristensen G, Holm R, Hagmar B, Johansson B. Disruption of the E1 and E2 reading frames of HPV 16 in cervical carcinoma is associated with poor prognosis. *Int J Gynaecol Pathol* 1998; 17: 146-153.
- [13] Park JS, Hwang ES, Park SN, et al. Physical status and expression of HPV genes in cervical cancer. *Gynecol Oncol* 1997; 65: 121-129.
- [14] Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87: 796-802.
- [15] Ho L, Chan SY, Burk RD, Das BC, Fujinaga K, Icenogle JP, Kahn T, Kiviat N, Lancaster W, Mavroumara-Nazos P, et al. The genetic drift of human papillomavirus type 16 is a means of reconstructing prehistoric viral spread and the movement of ancient human populations. *J Virol*. 1993; 67: 6413-23.
- [16] Tachezy R, Rector A, Havelkova M, Wollants E, Fiten P, Oudenakker G, Jenson B, Sundberg J, Van Ranst M. Avian papillomaviruses: the parrot *Psittacus erithacus* papillomavirus (PePV) genome has a unique organization of the early protein region and is phylogenetically related to the chaffinch papillomavirus. *BMC Microbiol*. 2002; 2: 19.
- [17] zur Hausen, H. Papillomaviruses in human cancers. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 1999; 111: 581-587
- [18] Torrisi A, Del Mistro A, Onnis GL, Merlin F, Bertorelle R, Minucci D. Colposcopy, cytology and HPV testing in HIV-positive and HIV-negative women. *Eur. J. Gynecol. Oncol*. 2000; 21: 168-172.
- [19] Van Rants M, Tachezy R, Burk RD. Human papillomavirus types: a never ending story. In *Papillomavirus reviews*, Lacey C (ed.). Leeds University Press: Leeds, 1996; 1-20
- [20] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ; International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348: 518-27.

- [21] De Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186: 1-12.
- [22] Southern SA, Herrington CS. Molecular events in uterine cervical cancer. *Sex Transm Inf* 1998; 74: 101-109.
- [23] Bosch FX, Manos MM, Munoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 796-802.
- [24] Ho GYF, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med* 1998; 338: 423-428.
- [25] Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol* 1993; 12: 186-192.
- [26] Syrjänen KJ. Natural history of genital human papillomavirus infections. In *Papillomavirus Reviews*, Lacey C (ed.). Leeds University Press: Leeds, 1996; 189-206.
- [27] Herrington CS. Human papillomavirus and cervical neoplasia II: interaction with other factors. *J Clin Pathol* 1995; 48: 1-6.
- [28] Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, et al. Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 958-964.
- [29] Remmink AJ, Walboomers JMM, Helmerhorst TJM, et al. The presence of persistent high-risk HPV genotypes in dysplastic cervical lesions is associated with progressive disease - natural history up to 36 months. *Int J Cancer* 1995; 61: 306-311.
- [30] Moreno V, Munoz N, Bosch FX, et al. Risk factors for progression of cervical intraepithelial neoplasia grade III to invasive cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev* 1995; 4: 459-467.
- [31] Ho GYG, Burk RD, Klein S, et al. Persistent genital human papillomavirus as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1365-1371.
- [32] Xi LF, Demers GW, Koutsky LA, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 variants indicates establishment of persistent infection. *J Infect Dis* 1995; 172: 747-755.
- [33] Xi LF, Koutsky LA, Galloway DA, et al. Genomic variation of human papillomavirus type 16 and risk for high grade cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 796-802.
- [34] Conrad-Stoppler MC, Ching K, Stöppler H, Clancy K, Schlegel R, Icenogle J. Natural variants of the human papillomavirus type 16 E6 protein differ in their abilities to alter keratinocyte differentiation and to induce p53 degradation. *J Virol* 1996; 70: 6987-6993.
- [35] Chow L, Hirochika H, Nasser M, Stoler M, Wolinsky S, Chin M. Human papillomavirus gene expression in papillomaviruses. *Cancer Cells* 1987; 5: 55-72.
- [36] Tommasino M and Crawford L. Human Papillomavirus E6 and E7: proteins which deregulate the cell cycle. *BioEssays* 1995; 17: 509-518.
- [37] Veress G, Szarka K, Dong X-P, Gergely L, Pfister H. Functional significance of sequence variation in the E2 gene and the long control region of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 1999; 80: 1035-1043.
- [38] www.hosprract.com/issues/1999/11/burk.htm
- [39] Icenogle JP, Sathya P, Miller DL, Tucker RA, Rawls WE. Nucleotide and amino acid sequence variation in the L1 and E7 open reading frames of human papillomavirus type 6 and type 16. *Virology* 1991; 184: 101-107.
- [40] McGlennen RC, Ghai J, Ostrow RS, LaBresh K, Schneider JF, Faras AJ. Cellular transformation by a unique isolate of human papillomavirus type 11. *Cancer Res* 1992; 52: 5872-5878.
- [41] Kitasato H, Delius H, zur Hausen H, Sorger K, Rost F, de Villiers E-M. Sequence rearrangements in the upstream regulatory region of human papillomavirus type 6: are these involved in malignant transition? *J Gen Virol* 1994; 75: 1157-1162.
- [42] Wheeler CM, Yamada T, Hildesheim A, Jenison SA. Human papillomavirus type 16 sequence variants: identification by E6 and L1 lineage-specific hybridisation. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 11-19.
- [43] Yamada T, Manos MM, Peto J, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol* 1997; 71: 2463-2472.
- [44] Desaintes C, Demeret C. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Semin Cancer Biol* 1996; 7: 339-47.
- [45] O'Connor M, Chan SY, Bernard HU. Transcription factor binding sites in the long control regions of genital HPVs. In: Meyers G, Bernard HU, Delius H, Baker C, Icenogle J, Halpern A,

Wheeler C, editors. Human papillomaviruses, compendium. Part III-A. Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory, 1995:21-40

[46] O'Connor M, Bernard HU. Oct-1 activates the epithelial-specific enhancer of human papillomavirus type 16 via a synergistic interactions with NFI at a conserved composite regulatory element. *Virology* 1995;207: 77-88.

[47] Schmidt M, Kedzia W, Gozdzicka-Jozefiak A. Intratype HPV16 sequence variation within LCR of isolates from asymptomatic carriers and cervical cancers. *J Clin Virol*. 2001;23: 65-77.

[48] Dong X-P, Stubenrauch F, Bayer-Finkler E, Pfister H. Prevalence of deletions of YY1-binding sites in episomal HPV 16 DNA from cervical cancers. *Int J Cancer* 1994; 58: 803-808.

[49] Park JS, Hwang ES, Lee CJ, et al. Mutational and functional analysis of HPV 16 URR derived from Korean cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* 1999; 74: 23-29.

[50] Durst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology* 1992; 189: 132-40.

[51] Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR. Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 1992; 23: 117-28.

[52] Komly CA, Breitburd F, Croissant O, Streeck RE. The L2 open reading frame of human papillomavirus type 1a encodes a minor structural protein carrying type-specific antigens. *J Virol* 1986; 60: 813-6.

[53] Cowser LM, PilaNICski WP, Jensen AB. Identification of the bovine papillomavirus L1 gene product using monoclonal antibodies. *Virology* 1988; 165: 613-5.

[54] Browne HM, Churcher MJ, Stanley MA, Smith GL, Minson AC. Analysis of the L1 gene product of human papillomavirus type 16 by expression in a vacNICia virus recombinant. *J Gen Virol* 1988; 69: 1263-73.

[55] Firzloff JM, Kiviat NB, Beckmann AM, Jenison SA, Galloway DA. Detection of human papillomavirus capsid antigens in various squamous epithelial lesions using antibodies directed against the L1 and L2 open reading frames. *Virology* 1988; 164: 467-77.

[56] Maki H, Fujikawa-Adachi K, Yoshie O. Evidence for a promoter-like activity in the short non-coding region of human papillomaviruses. *J Gen Virol* 1996; 77: 453-8.

[57] Geisen C, Kahn T. Promoter activity of sequences located upstream of the human papillomavirus types of 16 and 18 late regions. *J Gen Virol* 1996; 77: 2193-200.

[58] Sonnex C. Human papillomavirus infection with particular reference to genital disease. *J Clin Pathol* 1998; 51: 643-648.

[59] Casas L, Galvan SC, Ordonez RM Lopez N, Guido M, Berumen J. 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* 1999; 83: 449-455.

[60] Eriksson A, Herron JR, Yamada T, Wheeler CM. Human papillomavirus type 16 variant lineages characterized by nucleotide sequence analysis of the E5 coding segment and the E2 hinge region. *J Gen Virol* 1999; 80: 595-600.

[61] Zehbe I, Tommasino M. The biological significance of human papillomavirus type 16 variants for the development of cervical neoplasia. *Papillomavirus Rep* 1999; 10: 105-116.

[62] Londesborough P, Ho L, Terry G, Cyzick J, Wheeler C, Singer A. Human papillomavirus genotype as a predictor of persistence and development of high-grade lesions in women with minor cervical abnormalities. *Int J Cancer* 1996; 69: 364-368.

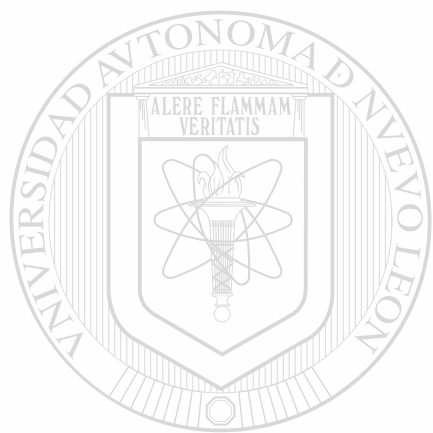
[63] Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res* 1998; 58: 829-833.

[64] Zehbe I, Voglino G, Delius H, Wilander E, Tommasino M. Risk of cervical cancer and geographical variations of human papillomavirus 16 E6 polymorphisms. *Lancet* 1998; 352: 1441-1442.

[65] Zehbe I, Tachezy R, Mytilineos J, Voglino G, Mikyskova I, Delius H, Marongiu A, Gissmann L, Wilander E, Tommasino M. Human papillomavirus 16 E6 polymorphisms in cervical lesions from different European populations and their correlation with human leukocyte antigen class II haplotypes. *Int J Cancer* 2001; 94: 711-716.

[66] Hu X, Guo Z, Tianyun P, et al. HPV typing and HPV 16 E6 sequence variations in synchronous lesions of cervical squamous cell carcinoma from Swedish patients. *Int J Cancer* 1999; 83: 34-37.

- [67] Bontkes HJ, van Duin M, de Gruul TD, et al. HPV 16 infection and progression of cervical intraepithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer* 1998; 78: 166-171.
- [68] Nindl I, Rindfleisch K, Lotz B, Schneider A, Dürst M. Uniform distribution of HPV 16 E6 and E7 variants in patients with normal histology, cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Int J Cancer* 1999; 82: 203-207.
- [69] Van Duin M, Snijders PJF, Vossen MTM, et al. Analysis of human papillomavirus type 16 E6 variants in relation to p53 codon 72 polymorphism genotypes in cervical carcinogenesis. *J Gen Virol* 2000; 81: 317-325.
- [70] Brady CS, Duggan-Keen MF, Davidson JA, Varley JM, Stern PL. Human papillomavirus type 16 E6 variants in cervical carcinoma: relationship to host genetic factors and clinical parameters. *J Gen Virol* 1999; 80: 3233-3240.
- [71] Giannoudis A, van Duin M, Snijders PJF, Herrington CS. Variation in the E2 binding domain of HPV 16 is associated with high grade squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Br J Cancer*. 2001; 84: 1058-63.
- [72] Fujinaga Y, Okazawa K, Nishikawa A, et al. Sequence variation of human papillomavirus type 16 E7 in pre-invasive and invasive neoplasia. *Virus Genes* 1994; 9: 85-92.
- [73] Eschle D, Duerst M, Ter Meulen J, et al. Geographical dependence of sequence variation in the E7 gene of human papillomavirus type 16. *J Gen Virol* 1992; 73: 1829-1832.
- [74] Song YS, Kee SH, Kim JW, Park NH, Chang WH, Lee HP. Major sequence variants in E7 gene of human papillomavirus type 16 from cervical cancerous and noncancerous lesions of Korean women. *Gynecol Oncol* 1997; 66: 275-281.
- [75] Giri I, Yaniv M. Structural and mutational analysis of E2 trans-activating proteins of papillomaviruses reveals three distinct functional domains. *EMBO J*. 1988; 7: 2823-9.
- [76] Turek LP. The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv Virus Res*. 1994; 44: 305-56.
- [77] Das BC, Sharma JK, Gopalakrishna V, Luthra UK. Analysis by polymerase chain reaction of the physical state of human papillomavirus type 16 DNA in cervical preneoplastic and neoplastic lesions. *J Gen Virol*. 1992; 73: 2327-36.
- [78] Graham DA, Herrington CS. Invasive squamous cell carcinoma of the cervix is associated with HPV 16 E7 gene disruption but not sequence variation. *Mol Pathol* 2000; 53: 201-206.
- [79] Hecht JL, Kadish AS, Jiang G, Burk RD. Genetic characterization of the human papillomavirus (HPV) 18 E2 gene in clinical specimens suggests the presence of a subtype with decreased oncogenic potential. *Int. J. Cancer* 1995; 60: 369-376.
- [80] Terry G, Ho L, Cuzick J. Analysis of E2 amino acid variants of human papillomavirus types 16 and 18 and their associations with lesion grade and HLA/DR type. *Int J Cancer* 1997; 73: 651-655.
- [81] Rose BR, Thompson CH, Zhang J, et al. Sequence variation in the upstream regulatory region of HPV 18 isolates from cervical cancers. *Gynecol Oncol* 1997; 66: 282-289.
- [82] Rose B, Steger G, Dong X-P, et al. Point mutations in Sp1 motifs in the upstream regulatory regions of human papillomavirus type 18 isolates from cervical cancers increase promoter activity. *J Gen Virol* 1998; 79: 1659-1663.
- [83] Stewart ACM, Eriksson AM, Manos MM, et al. Intratype variation in 12 human papillomavirus types: a worldwide perspective. *J Virol* 1996; 70: 3127-3136.
- [84] Grassmann K, Wilczynski SP, Cook N, Rapp B, Iftner T. HPV 6 variants from malignant tumours with sequence alterations in the regulatory region do not reveal differences in the activities of the oncogene promoters but do contain amino acid exchanges in the E6 and E7 proteins. *Virology* 1996; 223: 185-197.
- [85] Heinzel PH, Chan SY, Ho L, et al. Variation of human papillomavirus type 6 (HPV 6) and HPV 11 genomes sampled throughout the world. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 1746-1754.
- [86] Kovelman R, Bitter GK, Roman A, Brown DR, Barbosa MS. Human papillomavirus type 6: classification of clinical isolates and functional analysis of E2 proteins. *J Gen Virol* 1999; 80: 2445-2451.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



