



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Tipos de Papilomavirus de Alto Riesgo
Circulantes en Mujeres de San Luis Potosí y
Guanajuato**

Tesis que presenta

Luz Aurora Martínez Contreras

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

San Luis Potosí, S.L.P., Septiembre de 2005.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

COPIA CERTIFICADA

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 012 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 14 días del mes de septiembre del año 2005, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Carlos Barajas López	Presidente	IPICYT
Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Secretario	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Luz Aurora Martínez Contreras

sobre la Tesis intitulada:

Tipos de Papilomavirus de Alto Riesgo Circulantes en Mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Rubén Hipólito López Revilla

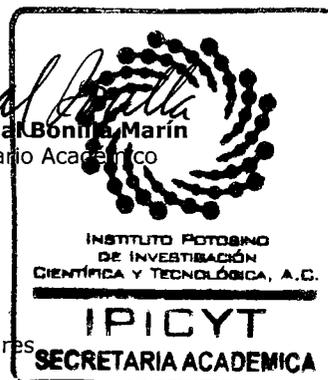
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 12:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 14 días del mes septiembre de 2005.


Dr. Marcia Bónilla Marín
Secretario Académico




Mtra. Ma. Elisa Lucio Aguilar
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

La presente tesis de maestría en ciencias en la especialidad de biología molecular fue elaborada por Luz Aurora Martínez Contreras y aprobada el 24 de agosto de 2005 por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dr. Carlos Barajas López



Dr. Rubén López Revilla



Dr. Luis A. Salazar Olivo

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria del Departamento de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Rubén López Revilla. Parte del trabajo fue posible por el apoyo financiero del Fondo Mixto CONACYT-San Luis Potosí (Proyecto FMSP4441) y del Fondo Mixto CONACYT-Guanajuato (Proyecto FONINV-Gto-C01-5751). Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 182032).

DEDICATORIAS

Con cariño a:

Mis padres:

Ing. Alejandro Martínez Casarín

Q.F.B. María Contreras de Mtz

Mi hermana, Marilé

Q.F.B. Rosita Zavala Carrasco

Ing. Ángel Pando Lázaro

La memoria de Tita

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rubén López Revilla, por sus enseñanzas y conocimientos que guiaron esta tesis.

A la Biol. Mireya Sánchez Garza, por su apoyo y facilidades en el trabajo de laboratorio.

A la Biol. M. Aurora Londoño Avendaño, por su participación en el procesamiento de las muestras

Al Dr Julio Ortiz Valdez, Dra. Yolanda Terán, Dra Ma. de Lourdes Martínez de Blanco, Lic. Enf. Dalila Álvarez Fortanelli, Dr. Raúl Rojas Hernández y Dra. Silvia Quintana Vargas, por la recolección de las muestras incluidas en este trabajo.

A los compañeros del Laboratorio 3, por las experiencias compartidas.

ÍNDICE

APROBACIÓN DE LA TESIS	2
CRÉDITOS	3
DEDICATORIAS	4
AGRADECIMIENTOS	5
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
INTRODUCCIÓN	
Epidemiología, etiología e historia natural del cáncer cervicouterino	11
Papilomavirus y CaCu	12
Diagnóstico de CaCu y detección de HPV	14
Tipificación de HPV	16
CaCu en México y San Luis Potosí	16
Propósito del trabajo	17
MATERIAL Y MÉTODOS	
Población muestreada	19
Toma de muestras de las pacientes	19
Extracción y purificación de DNA	20
Cuantificación del DNA de las muestras	20
Estandarización de la PCR	21
Detección del DNA de HPV	21
Tipificación de HPV	22
RESULTADOS	
Extracción y cuantificación del DNA de las muestras	23
Estandarización de las condiciones de la PCR	23
Cantidad de DNA	23
Temperatura de alineación	24
Concentración de MgCl ₂	24
PCR dúplex, directa y anidada	24
Algoritmo para la detección de DNA de HPV	25
Detección de HPV por amplificación del DNA viral en los raspados cervicales	26
Algoritmo para la tipificación de HPV-AR	27
Tipos de HPV-AR circulantes en San Luis Potosí y Guanajuato	28
Infecciones múltiples	29
DISCUSIÓN	30
REFERENCIAS	35

LISTA DE TABLAS

1. Parejas de oligonucleótidos empleadas	41
2. Contenido de las mezclas de PCR (50 µl)	42
3. Amortiguadores para las enzimas de restricción	43
4. Tamaños de los productos E6/E7 de diversos tipos de HPV y de los fragmentos generados con enzimas de restricción	44
5. DNA obtenido de las 370 muestras cervicales incluidas en este trabajo	45
6. Amplificación del producto E6/E7 ~250 pb de 30 muestras mediante PCR directa y anidada	46
7. DNA amplificable y productos de HPV en las muestras	47
8. Frecuencia de los tipos de HPV-AR en las mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato	48
9. Frecuencia de las infecciones únicas y múltiples por HPV-AR en las mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato	49
10. Frecuencia de los tipos de HPV-AR en las mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato con infecciones únicas	50
11. Frecuencia de los tipos de HPV-AR en las mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato con infecciones dobles	51
12. Frecuencia de los tipos de HPV en las mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato con infecciones dobles y triples	52

LISTA DE FIGURAS

1. Genoma de HPV16	53
2. Localización y productos de PCR de los oligonucleótidos consenso MY09/11, GP5+/6+, LCRS/E7AS y pU 1M/2R en el genoma de HPV16	54
3. La amplificación del gen de β -globina depende del contenido de DNA y la temperatura de alineación	55
4. La amplificación de los productos de ~450 pb, ~650 pb y ~250 pb depende de la temperatura de alineación y la concentración de cloruro de magnesio	56
5. Las mezclas dúplex con oligonucleótidos MY09/11 y pU 1M/2R inhiben la amplificación de los productos de ~450 pb y ~250 pb	57
6. La PCR anidada es más sensible que la PCR directa para la detección del DNA de HPV-AR	58
7. Diagrama de flujo del método empleado para la detección de DNA de papilomavirus por PCR	59
8. Ejemplo de la mayor sensibilidad de la PCR anidada para detectar HPV-AR	60
9. El producto de la región L1 puede ser amplificado en muestras E6/E7 negativas	61
10. Diagrama de flujo del método de tipificación de HPV-AR mediante pasos de digestión sucesiva del producto de E6/E7 de ~250 pb con enzimas de restricción	62
11. La digestión del producto E6/E7 de ~250 pb con <i>Ava</i> II permite distinguir tres tipos de HPV-AR: 16, 18 y 33	63
12. La incubación del producto E6/E7 ~250 pb con <i>Rsa</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Ava</i> I y <i>Acc</i> I permite distinguir los tipos de HPV-AR 31, 52, 35 y 58	64

RESUMEN

OBJETIVO. Determinar la frecuencia de los tipos de papilomavirus humano (HPV) de alto riesgo (AR) en las lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cérvix en los estados de San Luis Potosí (SLP) y Guanajuato. **MÉTODOS.** Incluimos 370 muestras de exudado cervical de 250 mujeres de SLP y 120 de Guanajuato con displasia leve, moderada, severa o cáncer cervicouterino (CaCu) invasor. Para detectar HPV empleamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con tres parejas de oligonucleótidos universales: una que amplifica parte del gen L1 (MY09/11) en una reacción convencional y dos que amplifican la región E6/E7 de HPV de alto riesgo (AR) mediante PCR anidada (parejas de la primera reacción: LCRS/E7AS; de la segunda: pU 1M/2R). Para la amplificación incluimos tres controles (positivo: DNA de células HeLa; housekeeping: gen de β -globina; negativo: agua). Identificamos siete tipos de HPV-AR (-16, -18, -31, -33, -35, -52, -58) con el método de Fujinaga et al. (*J Gen Virol* 72:1039-44, 1991), basado en el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) del producto E6/E7 de ~250 pares de bases. **RESULTADOS.** Obtuvimos 0.053-166.95 μ g de DNA por muestra; ≤ 100 ng en cinco y ≥ 100 ng en las 365 muestras restantes. Al comparar la amplificación de E6/E7 por PCR directa y anidada en 30 muestras, obtuvimos 11 positivas con la primera reacción (36.7%) y 24 (80%) con la reacción anidada, por lo cual decidimos emplear ésta en el trabajo. Empleamos un algoritmo de tres pasos para obtener los productos de HPV y determinar la amplificabilidad del DNA: 1) PCR anidada para E6/E7 \rightarrow 2) PCR para L1 en muestras negativas del primer paso \rightarrow 3) PCR de β -globina en muestras negativas del segundo paso. En 365 muestras (98.6%) obtuvimos amplicones de E6/E7, L1 o β -globina y de HPV en 362 (97.9%): de E6/E7 en 331 (89.5%) y de L1 en 31 (8.4%); en tres muestras (0.8%) sólo obtuvimos amplicones de β -globina. No fueron amplificables cinco muestras (1.4%) que contenían ≤ 100 ng de DNA. Para identificar los 331 amplicones de HPV-AR empleamos un algoritmo de dos pasos: 1) restricción de los productos E6/E7 ~250 pb con *AvaII* \rightarrow 2) restricción de los productos *AvaII*-resistentes con *RsaI*-*BglII*-*AvaI*-*AccI*. La frecuencia general de los tipos de HPV-AR en los dos estados fue: HPV-16 (60.5%), -31 (13.4%), -18 (10.3%), -52 (6.8%), -35 (5.6%), -33 (1.5%) y -58 (1.0%). Había dos tipos de HPV-AR en 69 muestras (20.8%) y tres tipos en cinco muestras (1.5%). La frecuencia de los tipos de HPV-AR en las infecciones dobles fue, en orden descendente: HPV-16 (42.0%), -31 (18.8%), -52 (12.3%), -35 (11.6%), -18 (10.9%), -58 (2.2%) y -33 (1.5%); y en éstas el tercer tipo más frecuente fue HPV-18 en SLP y HPV-52 en Guanajuato. Identificamos infecciones triples en SLP pero no en Guanajuato y en ellas la frecuencia fue, en orden descendente: HPV-16, -31, -35, -52 y -18. **CONCLUSIONES.** Con los métodos empleados la inmensa mayoría (98.6%) de las muestras contienen suficiente DNA (≥ 100 ng) para tipificar HPV-AR. Para detectar HPV-AR la PCR anidada de E6/E7 es unas dos veces más sensible que la PCR directa. Los dos algoritmos empleados permiten la detección y tipificación eficiente de HPV-AR. La inmensa mayoría de las muestras de lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cérvix incluidas en el trabajo contienen HPV (97.9%); la frecuencia de la infección cervical por HPV-AR fue 84.8% en SLP y 99.2% en Guanajuato. Los siete tipos de HPV-AR identificables con el método empleado circulan en SLP y seis Guanajuato. La quinta parte de las muestras tienen infecciones dobles o triples, con gran predominio de las dobles (93%). En las mujeres de SLP/Guanajuato con lesiones del cérvix las frecuencias porcentuales de los tipos de HPV-AR son: HPV-16 (62.6/56.4), -31 (11.9/16.4)-18 (10.4/10.0), -52 (6.3/7.9), -35 (5.9/5.0), -33 (1.1/2.1), y -58 (1.5/0).

ABSTRACT

OBJECTIVE: To determine the frequency of high risk (HR) human papillomavirus (HPV) types in preneoplastic and neoplastic cervical lesions in the states of San Luis Potosí (SLP) and Guanajuato, Mexico. **METHODS:** 370 cervical scrapings from 250 women from SLP and 120 from Guanajuato with slight, moderate or severe dysplasia, or invasive cervical cancer were analyzed. HPV detection was performed with the polymerase chain reaction (PCR) using three universal primer pairs: one which amplifies the L1 gene (MY09/11) in a conventional reaction, and two which amplify the E6/E7 region of HR-HPV through a nested PCR (pair of the first reaction: LCRS/E7AS; pair of the second reaction: pU1M/2R). Three controls were included in PCR mixtures (positive: HeLa DNA; housekeeping: β -globin; negative: water). Seven HR-HPV (-16, -18, -31, -33, -35, -52, -58) can be identified with the method of Fujinaga et al. (*J Gen Virol* 72:1039-44, 1991) based on restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the ~250-base pair PCR product. **RESULTS:** Amounts of DNA ranging from 0.053 to 166.95 μ g were obtained from all samples; five contained \leq 100 ng and the remaining 365 contained \geq 100 ng. E6/E7 amplification by direct and nested PCR was compared in 30 samples: 11 were positive with direct PCR (36.7%) and 24 with nested PCR (80%); for this reason nested PCR was used for HPV detection. The following three-step algorithm was used to generate HPV products and to determine DNA amplificability: 1) nested E6/E7 PCR \rightarrow 2) L1 PCR for the negative samples of the first step \rightarrow 3) β -globin PCR for the negative samples of the second-step. E6/E7, L1 or β -globin products were obtained in 365 samples (98.6%); HPV products in 362 samples (97.9%): E6/E7 in 331 (89.5%) and L1 in 31 (8.4%); only β -globin products were amplified in three samples (0.8%). The five samples containing \geq 100 ng of DNA did not amplify any PCR product. The following two-step algorithm was used to genotype HR-HPV: 1) restriction of the E6/E7 ~250 bp products with *Ava* II \rightarrow 2) restriction of the *Ava*II-insensitive products with *Rsa*I-*Bgl*II-*Ava*I-*Acc*I. The general frequency of HR-HPV types in both states was: HPV-16 (60.5%), -31 (13.4%), -18 (10.3%), -52 (6.8%), -35 (5.6%), -33 (1.5%) and -58 (1.0%). Two HR-HPV types were identified in 69 samples (20.8%) and three types in five samples (1.5%). The frequency of HR-HPV types in double infections was: HPV-16 (42.0%), -31 (18.8%), -52 (12.3%), -35 (11.6%), -18 (10.9%), -58 (2.2%) and -33 (1.5%); the third most frequent HR-HPV type in these cases was HPV-18 in SLP and HPV-52 in Guanajuato. Triple infections were detected in SLP but not in Guanajuato and the HR-HPV type frequency was, in descending order: HPV-16, -31, -35, -52 and -18. **CONCLUSIONS:** With the methods used here we obtained enough DNA (\geq 100 ng) from almost all samples (98.6%) in order to genotype HR-HPVs. E6/E7 HR-HPV detection is two times more sensitive with nested than with conventional PCR. The two algorithms developed allow efficient HR-HPV detection and genotyping. Almost all preneoplastic and neoplastic cervical samples included contain HPV (97.9%); the frequency of HR-HPV cervical infection is 84.8% in SLP and 99.2% in Guanajuato. All seven identifiable HR-HPV types were found in SLP and six in Guanajuato. One-fifth of the samples have double or triple infections where the first predominate (93%). The frequencies (per cent) of HR-PPV types in women from SLP/Guanajuato with cervical lesions are: HPV-16 (62.6/56.4), -31 (11.9/16.4)-18 (10.4/10.0), -52 (6.3/7.9), -35 (5.9/5.0), -33 (1.1/2.1), and -58 (1.5/0).

INTRODUCCIÓN

Epidemiología, etiología e historia natural del cáncer cervicouterino

Desde mediados del siglo XX las enfermedades de los países en desarrollo se encuentran en transición; todavía conservan la patología de la pobreza (enfermedades infecciosas y parasitarias, desnutrición, alcoholismo) pero en ellos han surgido padecimientos de las sociedades del primer mundo (cáncer, aterosclerosis, diabetes y otras enfermedades metabólicas) (Alonso de Ruiz et al. 2001). El cáncer cervicouterino (CaCu) se encuentra en la encrucijada de esta transformación. Forma parte de la patología de la pobreza por su frecuencia elevada pero es una enfermedad neoplásica que corresponde más a los países del primer mundo.

El CaCu es la segunda causa de muerte entre las mujeres a nivel mundial (Pisani et al. 2002) y la principal en los países en desarrollo (Lewis 2004, Pisani et al. 1999). En el año 2000 el 80% de los 500,000 casos nuevos y 190,000 de las defunciones ocurrieron en el mundo en desarrollo y los países latinoamericanos tienen tasas de incidencia del CaCu tan altas que sólo son superadas por los países de África Oriental (Lewis 2004).

El CaCu tendría las mismas tasas de morbilidad y mortalidad en todo el mundo si no fuera porque en la mayoría de los países desarrollados se han implementado programas nacionales de diagnóstico y tratamiento precoz que han reducido su frecuencia, hasta en un 70% en Estados Unidos y un 60% en Canadá e Islandia (Pisani et al. 2002).

El riesgo de desarrollar CaCu aumenta con el inicio temprano de las relaciones sexuales, el número de parejas sexuales, el uso prolongado de anticonceptivos orales y el tabaquismo (Reeves et al. 1989). En México y otros países en desarrollo se asocia a los factores relacionados con la pobreza tales como la baja escolaridad, el desempleo, el bajo nivel socioeconómico, la residencia en áreas rurales y la falta de acceso efectivo a los servicios de salud (Palacio-Mejía et al. 2003, Lazcano-Ponce et al. 1997, Soe 1992).

El CaCu usualmente tiene una larga evolución que se inicia con una serie de alteraciones en el epitelio cervical (“displasia”) denominada genéricamente neoplasia intraepitelial cervical (NIC), que gradualmente pueden volverse más severas y en un término de 15-20 años pueden progresar al carcinoma invasor (Ponten y Guo 1998). La introducción del concepto de NIC por Richard (1973) unificó los cambios histológicos observados en lesiones de tres grados (la displasia leve o NIC1 progresa a displasia moderada o NIC2 y puede llegar a la displasia severa o NIC3); esta terminología sigue empleándose en el diagnóstico histológico.

Los cambios NIC progresivos están asociados a la presencia de HPV. Wright et al. (2000) encontraron DNA de tipos heterogéneos de HPV de alto y bajo riesgo en el 80% de las lesiones precancerosas de bajo grado (NIC1) y de alto riesgo en el 90% de las lesiones precancerosas de alto grado (NIC2 y NIC3).

Las displasias leves generalmente remiten y desaparecen espontáneamente mientras que las displasias moderadas y severas y el carcinoma in situ raras veces lo hacen, ya que más frecuentemente persisten o progresan al CaCu invasor (Shiffman et al. 1993, Syrjanen et al. 1988, Nasiell et al. 1986, 1983).

Papilomavirus y CaCu

zur Hausen propuso en 1977 y una década después pudo demostrar que el virus del papiloma humano (HPV) es el agente infeccioso de transmisión sexual responsable de la transformación neoplásica del cuello uterino (zur Hausen 1988). Esta hipótesis ha sido validada con el hallazgo de la presencia de secuencias del genoma de HPV en el 99.7% de los casos de CaCu invasor (Walboomers et al. 1999). HPV es el patógeno más común de transmisión sexual (Volkow et al. 2001).

Actualmente se acepta que la infección del cérvix por ciertos tipos de HPV denominados “de alto riesgo” es el factor necesario en la etiología del CaCu (Walboomers et al. 1999, Muñoz et al. 1993);

Los HPV son virus epiteliotrópicos de DNA de la familia Papillomaviridae, cuyos viriones sin envoltura lipídica tienen una cápside icosaédrica con un diámetro de 52-55 nm que se clasifican en tipos, subtipos y variantes por la homología de las secuencias nucleotídicas de su genoma (Palefsky et al. 1995).

En la actualidad se reconocen más de 80 tipos diferentes, de los cuales 40 infectan el aparato genital (de Villiers 2001). Se denominan de bajo riesgo (HPV-BR) los que se encuentran en verrugas y lesiones benignas y de alto riesgo (HPV-AR) los que tienen potencial oncogénico y se encuentran en los carcinomas. Los principales tipos de bajo riesgo son once (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81) y los de alto riesgo son quince (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) (Muñoz et al. 2003).

Los dos tipos de HPV-AR asociados con mayor frecuencia a tumores malignos son HPV-16 y HPV-18. El primero es responsable de alrededor del 50% y el segundo del 20% de los casos de CaCu invasor en el mundo (Walboomers et al. 1999, Bosch et al. 1995).

Algunas variantes de HPV con mayor potencial oncogénico son más prevalentes en los países en desarrollo donde contribuyen a las altas tasas de incidencia y mortalidad. En México la probabilidad de padecer cáncer cervicouterino relacionado con la variante asiático-americana (AA) de HPV-16 es varias veces mayor que con la variante europea, y alrededor del 25% de los casos de CaCu invasor en el país se atribuyeron a la variante AA (Berumen et al. 2001).

El genoma de HPV consiste en DNA circular de doble cadena de cerca de 8,000 pares de bases, constituido por ocho genes y una región regulatoria no codificante con sitios de unión para factores proteínicos y hormonales del hospedero necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación. Los genes expresados en las etapas tempranas del ciclo de replicación viral (i.e., antes de la replicación del genoma viral) son llamados E (por "early") y los expresados en las etapas tardías (i.e., después de la replicación del genoma viral) son llamados L (por "late"). Hay seis genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y dos tardíos (L1 y L2). Los primeros codifican proteínas involucradas en la replicación y la regulación de la expresión y en la oncogenicidad viral. Los genes tardíos codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral (Fig. 1).

La infección se manifiesta después de un periodo de latencia que puede durar semanas o meses, al cabo del cual las lesiones pueden aparecer con tres modalidades: infección clínica, subclínica y latente. La infección clínica es asintomática pero provoca verrugas o condilomas visibles a simple vista. La

infección subclínica se hace evidente con un procedimiento auxiliar como el colposcopio o microscopio. En la infección latente no hay evidencia clínica ni histológica y puede identificarse sólo mediante detección del DNA de HPV (Alonso de Ruiz et al. 2001)

Diagnóstico de CaCu y detección de HPV

El método más ampliamente usado para la detección de CaCu es la citología vaginal, conocida como prueba de Papanicolaou, que debe realizarse periódicamente a todas las mujeres sexualmente activas dentro de los programas nacionales para la prevención del CaCu.

Las células obtenidas de un raspado de la pared cervical son colocadas en una laminilla, fijadas, teñidas y estudiadas al microscopio por el patólogo. El resultado citológico anormal se confirma mediante colposcopia (estudio del cérvix al microscopio esteroscópico) y toma de biopsia. La sensibilidad del método de Papanicolaou para detectar lesiones de alto grado es variable (44-88%) dependiendo del laboratorio donde se realice y los diagnósticos falsos-negativos son frecuentes (Chin-Hong y Klausner 2004).

Como la mayoría de las infecciones por HPV son subclínicas, es difícil detectarlas por examen citológico, colposcópico o histopatológico y las infecciones latentes no pueden detectarse con ninguno de los métodos anteriores.

Con el advenimiento de la biología molecular se desarrollaron métodos capaces de detectar la presencia del DNA de HPV, los cuales se han usado extensamente para determinar el papel del virus en la etiología y la historia natural de las enfermedades a la que se asocia. Estos métodos también se emplean como complementarios a la citología para el diagnóstico de CaCu.

Los métodos moleculares se basan en la especificidad de la complementariedad entre los ácidos nucleicos. Tres son los métodos principales para la detección de HPV: 1) métodos de sondas directas (Southern blot, hibridación in situ e inmunohistoquímica), 2) amplificación de señal (Captura de híbridos de segunda generación, HC2) y 3) amplificación de genes blanco (reacción en cadena de la polimerasa, PCR, y sus variantes) (Chin-Hong y Klausner 2004, Hubbard 2003). Estos métodos tienen diferentes ventajas y desventajas.

Las ventajas de los métodos de sondas directas incluyen al Southern blot (el estándar de oro para el análisis genómico de HPV) y se correlacionan con el estadio morfológico de la neoplasia. El método de amplificación de señal HC2 está disponible comercialmente, ha sido aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) de EE UU y es cuantitativo. Los métodos de amplificación de genes blanco son flexibles (permiten la tipificación y la determinación de la carga viral), son los más sensibles y permiten análisis múltiples.

Las desventajas de los métodos de sondas directas son su baja sensibilidad, procesos muy laboriosos y la necesidad de grandes cantidades de DNA purificado. El método de amplificación de señal, HC2, se basa en una tecnología patentada y sólo distingue entre tipos de alto y bajo riesgo. En los de amplificación de genes blanco las muestras pueden contaminarse fácilmente, los protocolos no han sido estandarizados y se requiere una licencia para el método comercial de las tiras lineales de la compañía Roche.

La tecnología de amplificación de genes es la más flexible para abordar los aspectos de detección, genotipificación, carga viral, secuenciación y análisis de mutantes de HPV (Monk et al. 1994, Schiffman et al. 1991). La PCR es el método molecular de mayor sensibilidad pues permite detectar desde 10 moléculas de DNA presentes en una muestra. La sensibilidad depende de la pareja de oligonucleótidos utilizada, el tamaño del producto amplificado y la DNA polimerasa usada. La PCR genera aproximadamente un millón de copias de cada molécula de DNA amplificada y los productos generados por ella pueden visualizarse con técnicas tales como electroforesis, dot blot o la hibridación en tiras lineales.

La PCR se lleva a cabo con una DNA polimerasa y parejas de oligonucleótidos que amplifican secciones específicas del DNA. Para el análisis de los genotipos de HPV son de interés las áreas de su genoma que exhiben polimorfismos tipo-específicos. La región del gen L1 de HPV es la de mayor variabilidad polimórfica. También se han encontrado polimorfismos en las secuencias de los genes E6 y E7. Los oligonucleótidos usados en la PCR se basan en secuencias conservadas o consenso que flanquean las secuencias polimórficas tipo-específicas. Las parejas de oligonucleótidos más usadas para la detección de HPV que amplifican segmentos del gen L1 son MY09/11 (Mannos et al. 1989), GP5+/6+

(De Roda et al. 1995), L1C1/L2C2 (Yoshikawa et al. 1991) y PGMY09/11 (Gravitt et al. 2000). Para la amplificación de segmentos de los genes E6 y E7 se emplean pU 1M/2R (Fujinaga et al. 1992) y LCRS/E7AS (Noda et al. 1998).

Tipificación de HPV

La tipificación de HPV permite detectar a las mujeres que portan HPV-AR y tienen mayor riesgo de desarrollar neoplasias. La PCR para amplificar secuencias de HPV y el polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (en inglés, restriction fragment length-polymorphism, RFLP) como método post-amplificación para identificar tipos virales constituyen la tecnología de entrada de los métodos de tipificación (Hubbard 2003).

La RFLP es una herramienta de diagnóstico molecular basada en la identificación de diferencias de secuencia que afectan el reconocimiento de las enzimas de restricción (endonucleasas que hidrolizan enlaces fosfato-desoxirribosa de secuencias específicas) y permite la tipificación viral. La RFLP es el método más sencillo para detectar cambios de secuencia porque no requiere isótopos radiactivos y los dos instrumentos necesarios para llevarla a cabo son accesibles: un termociclador y un sistema de electroforesis horizontal (Mas-Oliva 2004).

Varios estudios han aportado diversos métodos de RFLP para la tipificación de HPV. Los más utilizados están dirigidos al gen L1 (Ting et al. 1991) y a los genes E6/E7 (Fujinaga et al. 1991).

La detección de la infección por HPV depende no sólo de la población estudiada y la técnica utilizada sino también de la manera de obtener la muestra cervical (Lazcano-Ponce et al. 1999). La eficiencia de detección del DNA de HPV puede ser afectada por la cantidad, calidad, condiciones y tiempo de almacenamiento de la muestra (Iftner y Villa 2003). Para optimizar este análisis se recomiendan dispositivos de recolección como el cytobrush que maximizan la cantidad de muestra.

CaCu en México y San Luis Potosí

En el año 2000 la incidencia del CaCu en México por 100,000 mujeres fue de 40.5 y la de mortalidad fue de 17.1 (Lewis 2004, Arrossi et al. 2003), lo que da un

promedio de 12 mujeres fallecidas cada 24 horas. En los estados de San Luis Potosí (SLP) y Guanajuato las tasas de mortalidad por 100,000 mujeres para el mismo año fueron respectivamente 18.0 y 9.4.

Lazcano-Ponce et al. (2001) encontraron una prevalencia de HPV del 16.7% en mexicanas menores de 25 años de edad, que disminuye a 3.7% en las de 25-44 años y llega al 23% en las mayores de 65 años. En este mismo estudio encontraron que los tipos de HPV-AR son más frecuentes en todos los grupos de edad y los de HPV-BR son menos frecuentes en las mujeres menores de 25 años y aumentan con la edad.

Nuestro grupo analizó la frecuencia de lesiones preneoplásicas y malignas en 1940 biopsias y conos del cérvix de mujeres con displasias de la población abierta que residen en el Altiplano y la Zona Centro del estado de San Luis Potosí. Las biopsias y conos fueron tomados en la Clínica de Displasias del Centro de Salud “Dr. Juan H. Sánchez” durante el periodo de un año comprendido de julio de 2000 a junio de 2001. El procesamiento de las muestras y el diagnóstico histopatológico fue realizado en el Departamento de Patología del Hospital Central “Dr. Ignacio Morones Prieto”. Hubo una alta prevalencia de lesiones preneoplásicas (85.8%) de bajo grado (NIC1, 66.1%) y de alto grado (NIC2 10.4%, NIC3 9.3%) y de CaCu invasor (29%), con predominio en las mujeres más jóvenes (Rosales-Ortuño et al. 2003, R. López-Revilla y col. Manuscrito en preparación). La alta prevalencia de lesiones de alto grado principalmente en la jurisdicción de la ciudad de San Luis Potosí nos llevó a preguntarnos cuáles son los tipos de HPV circulantes en el estado de San Luis Potosí y en los estados vecinos.

Propósito del trabajo

El propósito de este trabajo fue determinar la frecuencia de los tipos de HPV-AR circulantes en el estado de San Luis Potosí y Guanajuato. Para ello incluimos en el estudio muestras de raspados cervicovaginales de mujeres con CaCu y lesiones premalignas diagnosticadas clínicamente en diversos hospitales, centros de salud y consultorios privados de la ciudad de San Luis Potosí y en tres jurisdicciones del estado de Guanajuato. Mediante amplificación por PCR de los genes de HPV L1 (Fig. 2A) y E6/E7 (Fig. 2B) detectamos la infección por los tipos de HPV-AR más

comunes. Para identificar los tipos de HPV-AR empleamos el método de RFLP descrito por Fujinaga et al. (1991).

Con los métodos empleados en este trabajo encontramos que la inmensa mayoría de las muestras contienen suficiente DNA para tipificar HPV-AR, que la PCR anidada de E6/E7 es unas dos veces más sensible que la PCR directa y que la inmensa mayoría de las lesiones preneoplásicas y neoplásicas del cérvix contienen HPV. La frecuencia de HPV-AR fue 84.8% en las muestras de SLP y 99.2% en las de Guanajuato y los siete tipos de HPV-AR identificables con el método empleado circulan en SLP y seis de ellos en Guanajuato. La quinta parte de las muestras tienen infecciones dobles o triples en una proporción de 13:1. Las frecuencias porcentuales de los tipos de HPV-AR en SLP/Guanajuato son: HPV-16 (62.6/56.4), -31 (11.9/16.4), -18 (10.4/10.0), -52 (6.3/7.9), -35 (5.9/5.0), -33 (1.1/2.1), y -58 (1.5/00).

MATERIAL Y MÉTODOS

Población muestreada

Las muestras de raspado cervical provenían de mujeres de los estados de San Luis Potosí y Guanajuato con lesiones del cérvix diagnosticadas mediante exploración ginecológica, colposcopia y análisis citológico de raspados cervicales (Papanicolaou). Las de San Luis Potosí provenían de la capital del estado y habían sido atendidas en la Clínica de Displasias de los Servicios de Salud por el Dr. Julio Ortiz Valdez, en el consultorio de la Facultad de Enfermería de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por la Dra. Yolanda Terán, y en la consulta privada de tres médicos citólogos, la Dra. Ma. de Lourdes Martínez de Blanco, Dr. Julio Ortiz Valdez y Lic. Enf. Dalila Álvarez Fortanelli. Las mujeres del estado de Guanajuato habían sido atendidas en los hospitales generales de la Secretaría de Salud de las jurisdicciones sanitarias con sede en Irapuato, Celaya y León y las muestras nos fueron enviadas por el Dr. Raúl Rojas Hernández y la Dra. Silvia Quintana Vargas.

Toma de muestras de las pacientes

Para la toma de cada muestra proporcionamos a nuestros colaboradores clínicos: 1) un cepillo para colecta de raspado cérvico-vaginal (“cytobrush”); 2) 1 ml del medio estéril de colecta y transporte para las muestras (PBS o solución salina amortiguada con fosfatos con EDTA disódico: NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂HPO₂ 2 mM, EDTA 25 mM, pH 7.4) en tubos de polipropileno (Nalgene cryoware, Nalge Nunc, Rochester, NY, EUA) de 5 ml con tapa de rosca; 3) 1.5 ml de etanol de 96° en tubos de microcentrífuga de 1.5 ml para la fijación de la muestra; y 4) una hoja de registro de los datos clínicos de la paciente.

Extracción y purificación de DNA

Un ml de cada muestra fijada se transfirió del tubo de polipropileno a un tubo que fue colocado en la microcentrífuga Hettich Mikro 20 (Hettich, Colonia, Alemania) y fue centrifugado por 5 min a 13,000 rpm ($16,250\times g$). Para disolver y digerir las proteínas a cada pastilla se añadieron 500 μ l de TES (Tris-HCl 10 mM; Na₂EDTA 2 mM, NaCl 0.4 M; pH 8.0) seguidos de 50 μ l de SDS al 10% y 20 μ l de proteinasa K (20 mg/ml); las mezclas de digestión fueron incubadas 3 h a 55°C para degradar las proteínas. Luego se agregaron 151.4 μ l de NaCl 5 M y la mezcla se volvió a centrifugar por 15 min. El sobrenadante fue decantado a un tubo nuevo al que añadimos 576.8 μ l de isopropanol frío y lo dejamos reposar durante 10 min en el refrigerador para precipitar los ácidos nucleicos. El tubo fue centrifugado nuevamente 10 min y el sobrenadante fue descartado por decantación. En seguida lavamos la pastilla de ácidos nucleicos con 1 ml de etanol al 70% y la centrifugamos 1 min a 10,000 rpm ($9,615\times g$). El etanol sobrenadante fue descartado por aspiración con una micropipeta, y para secar la pastilla el tubo fue invertido sobre una toalla de papel a temperatura ambiente por 15 min. La pastilla con ácidos nucleicos fue disuelta con 50 o 100 μ l de TE 1 \times (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0) dependiendo de la masa de la pastilla obtenida. Finalizado el proceso de extracción, se corrobora la calidad del DNA obtenido mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (IBI, Shelton Scientific, Shelton, IA, EUA) de 2 μ l de DNA de cada muestra, seguida de tinción con bromuro de etidio.

Cuantificación del DNA de las muestras

Se llevó a cabo por fluorimetría con el kit PicoGreen dsDNA Quantitation (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA). Para cuantificar las muestras, cada vez fue generada una curva estándar con tubos que contenían 1, 5, 10, 25 y 50 ng de DNA del fago lambda de concentración conocida incluida en el kit. En cada pozo de una microplaca FIA negra de 96 pozos (Greiner bio-one, Frickenhausen, Alemania) fueron colocados 198 μ l de la solución de ensayo (PicoGreen 1:400 en TE 1 \times) y 2 μ l del DNA estándar o de la muestra problema. Las muestras fueron leídas en el

fluorómetro *GENios* (TECAN, San Jose, CA, EUA) empleando el programa Magellan 4.

Estandarización de la PCR

Llevamos a cabo experimentos de “gradientes” de concentración de DNA y $MgCl_2$ así como de temperatura de alineación, para optimizar cada una de estas variables en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para determinar la concentración apropiada de DNA total con los oligonucleótidos que generan el fragmento de ~260 pb del gen de β -globina, el “gradiente” de DNA se obtuvo mediante diluciones dobles seriadas de una muestra problema, de manera tal que las mezclas de reacción contenían desde 50 ng hasta 0.78 ng de DNA de la muestra 001. Para las mezclas de PCR con cada pareja de oligonucleótidos utilizada (Tabla 1) hicimos también “gradientes” de concentración de $MgCl_2$ (concentraciones finales: 1, 2, 2.5, 3, 4 y 5 mM) y de temperatura de alineación (55°, 55.6°, 56.3°, 57°, 57.7°, 58.2°, 58.9°, 59.7°, 60.4°, 61.4°C). Mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% de muestras de 10 μ l, seguida de tinción con bromuro de etidio, fueron visualizados los productos de PCR de cada reacción por transiluminación con luz ultravioleta (ChemiDoc™ EQ, Biorad, Hercules, CA, EUA). Los pixeles que formaban las bandas principales de cada experimento de gradiente se determinaron con ayuda del programa Quantity One (BioRad, Hercules, CA, EUA). Por último, se graficó la magnitud de las bandas (pixeles) contra la variable analizada (temperatura, DNA, $MgCl_2$).

Detección del DNA de HPV

Los productos de PCR de ~250, ~450 y ~650 pb del DNA de HPV fueron amplificados por medio de la reacción en cadena de la polimerasa con las parejas de oligonucleótidos 1, 2 y 3 respectivamente (Tabla 1). Cada mezcla de PCR con un volumen final de 50 μ l fue preparada en tubos para PCR de 0.2 ml (Axygen, Union City, CA, EUA). La *Taq* DNA polimerasa empleada era recombinante y había sido producida por Invitrogen (Sao Paulo, Brasil). Los volúmenes y concentración de los componentes de las mezclas de PCR se detallan en la Tabla 2. Cada mezcla de

reacción fue sometida a 40 ciclos de amplificación en un Termociclador Touchgene Gradient (Techne, Staffordshire, Inglaterra). Antes de iniciar los ciclos de amplificación se incubaron las mezclas por 4 min a 94°C (“hot start”). Cada ciclo consistió de incubaciones sucesivas de 1 min a 94°C, 57° C y 72° C. Al final las mezclas fueron incubadas 10 min a 72°C. En cada experimento de amplificación se empleó como control positivo DNA de células HeLa y agua como control negativo. Mediante electroforesis en geles de agarosa al 1.5% de muestras de 10 µl seguida de tinción con bromuro de etidio, los productos de PCR de cada reacción fueron visualizados por transiluminación con luz ultravioleta.

Tipificación de HPV

Para determinar el tipo de HPV de alto riesgo adaptamos el método de tipificación basado en RFLP (polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción, en inglés *restriction fragment length polymorphism*) descrito por Fujinaga et al., 1991. Preparamos mezclas de digestión de 20 µl que contenían 8 µl de la mezcla de amplificación del producto de E6/E7 de ~250 pb, 1.5 µl (1.5 U) de la enzima de restricción pertinente, 2 µl del amortiguador correspondiente (Tabla 3) y 8.5 µl de agua. Las enzimas de restricción *Ava* I, *Ava* II y *Bgl* II provenían de BioLabs (Beverly, MA, EUA) en tanto que *Rsa* I y *Acc* I eran de Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). Las mezclas fueron incubadas a 37°C por 3 h. Mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.0% de muestras de 10 µl, y tinción con bromuro de etidio, fueron visualizados los fragmentos resultantes de la digestión de los productos de PCR de cada reacción por transiluminación con luz ultravioleta. Los RFLPs generados por las enzimas empleadas se enlistan en la Tabla 4.

RESULTADOS

Extracción y cuantificación del DNA de las muestras

El método de extracción con proteinasa K y la cuantificación con PicoGreen permitieron obtener cantidades suficientes de DNA (≥ 100 ng) en la mayoría de las muestras del cérvix para llevar a cabo varios análisis de PCR que requieren unos 25 ng por mezcla, por lo cual decidimos utilizarlo en el resto del trabajo.

El rendimiento mínimo y máximo de DNA de las muestras fue respectivamente 0.053 y 166.95 μ g. En la Tabla 5, se encuentra el rendimiento expresado en intervalos.

Estandarización de las condiciones de la PCR

Una vez extraído y cuantificado el DNA, el siguiente paso consistió en detectar el DNA de HPV de las muestras mediante PCR. Para obtener resultados confiables en este paso primero optimizamos algunas variables de la reacción tales como la cantidad de DNA problema, la temperatura de alineación y la concentración de magnesio para cada pareja de oligonucleótidos.

Cantidad de DNA

En mezclas con la pareja de oligonucleótidos para el gen de β -globina definimos la cantidad de DNA problema que se usaría en cada reacción. Hicimos un experimento de “gradiente” con diluciones dobles seriadas de DNA, comenzando con 50 ng hasta llegar a menos de 1 ng. Graficamos la magnitud (píxeles) de la banda principal de 260 pb contra la cantidad de DNA problema probada (50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.58, 0.78 ng). Analizando la gráfica observamos que conforme aumenta la cantidad de DNA que se usa en la mezcla de PCR hasta 25 ng también aumenta el número de píxeles de la banda principal y con 50 ng no hay aumento, por lo que concluimos que la reacción se satura. A partir de estos resultados decidimos usar 25 ng de DNA como molde para cada reacción (Fig. 3A y B).

Temperatura de alineación

Otra condición de la PCR optimizada fue la temperatura de alineación y cómo afecta ésta la cantidad de producto generado por cada pareja de oligonucleótidos que permite amplificar fragmentos del genoma de HPV de diferente tamaño (MY09/11, LCRS/E7AS y pU 1M/2R) o del gen de la β -globina. Los “gradientes” para cada pareja de oligonucleótidos tuvieron como temperatura mínima 55°C, con incrementos de menos de 1°C hasta llegar a 62°C. La intensidad de la fluorescencia de los productos (píxeles de la banda principal) obtenidos con las temperaturas empleadas con cada pareja de oligonucleótidos se detalla en las figuras citadas entre paréntesis: β -globina (Fig. 3C y D), MY09/11 (Fig. 4A), LCRS/E7AS (Fig. 4C) y pU 1M/2R (Fig. 4E).

En la gráfica de β -globina la intensidad de la banda principal aumenta con las temperaturas probadas, al contrario de lo que ocurre con las parejas de oligonucleótidos MY09/11, LCRS/E7AS y pU 1M/2R en cuyas gráficas la intensidad de las bandas principales decae conforme aumenta la temperatura. En cada gráfica observamos intensidad suficiente de la banda principal a 57°C, por lo cual decidimos utilizar la misma temperatura para todas las parejas de oligonucleótidos durante el resto del trabajo.

Concentración de $MgCl_2$

La última condición estandarizada fue la concentración de magnesio, para lo cual hicimos experimentos con 1, 2, 2.5, 3, 4 y 5 mM de $MgCl_2$ con cada pareja de oligonucleótidos. Al analizar la fluorescencia de las bandas principales de cada gráfica encontramos que la máxima intensidad fue obtenida con $MgCl_2$ 2.5 mM, por lo cual decidimos emplear esta concentración para el resto del trabajo con las parejas MY09/11 (Fig. 4B), LCRS/E7AS (Fig. 4D), y pU 1M/2R (Fig. 4F).

PCR dúplex, directa y anidada

Para ver si era posible establecer una PCR dúplex que permitiera amplificar simultáneamente los productos de ~250 y ~450 pb esperados con las parejas

MY09/11 y pU 1M/2R, probamos mezclas con concentraciones iguales de cada pareja (0.6 μ M c/u) tanto en la misma mezcla (“dúplex”) como por separado. Después de sujetar los productos a electroforesis en geles de agarosa observamos que en las mezclas dúplex la intensidad de la banda de ~450 pb era casi nula y la de ~250 pb era menor comparadas con la intensidad de cada una de estas bandas en las mezclas por separado. Por lo tanto, como parece haber interferencia entre las dos parejas de oligonucleótidos empleadas en la mezcla dúplex, decidimos no emplear esta mezcla para el resto del trabajo (Fig. 5).

En otro experimento comparamos la sensibilidad de la PCR directa y de la PCR anidada para la detección del DNA de HPV por amplificación de la región E6/E7. El ensayo directo fue realizado con 25 ng de DNA problema y la pareja de oligonucleótidos pU 1M/2R, que amplifica el producto de ~250 pb (Fig. 6A). El ensayo anidado consiste en dos reacciones sucesivas de PCR: en la primera reacción se amplifica un fragmento de ~650 pb con la pareja LCRS/E7AS; en la segunda reacción (“anidada”) se emplea parte de la mezcla la primera reacción que contiene el producto de ~650 pb amplificado previamente que sirve como molde para la segunda reacción que utiliza como oligonucleótidos internos los de la pareja pU 1M/2R que generan el producto final de ~250 pb (Fig. 6B y C).

Sometimos 30 muestras a PCR directa y anidada en las condiciones descritas. De esta manera obtuvimos 24 muestras positivas en PCR anidada y 11 en PCR directa (Tabla 6). En vista de que la detección del DNA de HPV mediante PCR anidada con la pareja de oligonucleótidos pU 1M/2R es unas dos veces más sensible que la PCR directa con los mismos oligonucleótidos, para el resto del trabajo decidimos emplear la PCR anidada.

Algoritmo para la detección del DNA de HPV

El algoritmo desarrollado en este trabajo para detectar la presencia de DNA de HPV se muestra en la Fig. 7.

Cada muestra es sometida primero a PCR anidada con la pareja de oligonucleótidos pU 1M/2R. Si se obtiene el producto de ~250 pb la muestra es considerada positiva para HPV-AR y sujeta a tipificación mediante análisis de

RFLP (ejemplo en la Fig. 8). Si no genera producto de ~250 pb, la muestra puede ser negativa, insuficiente o de calidad inadecuada y es sujeta a PCR con la pareja de oligonucleótidos MY09/11.

Si es generado el producto de ~450 pb la muestra es considerada positiva para tipos de HPV de alto o bajo riesgo de tipo indeterminado (ejemplo en la Fig. 9). Si no es generado el producto de ~450 pb, la muestra puede ser insuficiente o de calidad inadecuada, para definirlo es sujeta a PCR con los oligonucleótidos que amplifican β -globina.

Si el producto de β -globina es generado, la muestra se considera amplificable pero negativa para HPV y termina el proceso de detección.

Detección de HPV por amplificación del DNA viral en los raspados cervicales

Con el método que acabamos de describir analizamos 370 muestras de raspados cervicovaginales: 250 de la ciudad de San Luis Potosí (SLP) y 120 del estado de Guanajuato.

Entre las muestras de SLP obtuvimos DNA amplificable en 245, en 212 de las cuales pudimos detectar DNA de HPV-AR mediante la PCR anidada y en 30 de las muestras amplificables pudimos detectar DNA de HPV con los oligonucleótidos MY 09/11. En tres de las muestras amplificables no pudimos detectar la presencia de HPV.

Todas las 120 muestras de Guanajuato contenían DNA amplificable. Detectamos DNA de HPV-AR en 119 y en la muestra restante pudimos amplificar el producto esperado con los oligonucleótidos MY09/11.

Así, del total de 370 muestras procesadas obtuvimos DNA amplificable en 98.6% (89.5% de estas fueron HPV-AR, 8.4% HPV AR/BR y 0.8% HPV-negativas). El 1.4% restante contenía DNA no amplificable o insuficiente.

De las 250 muestras provenientes de la ciudad de SLP obtuvimos DNA amplificable en 98.0% (84.8% de estas fueron HPV-AR, 12.0% HPV AR/BR y 1.2% HPV-negativas). El 2.0% restante contenía DNA no amplificable o insuficiente.

En todas las 120 muestras provenientes del estado de Guanajuato obtuvimos DNA amplificable; 99.2% fueron HPV-AR y 0.8% a HPV AR/BR.

Estos resultados se resumen en la Tabla 7.

Los porcentajes de detección de HPV para las mujeres de SLP se asemejan más a los porcentajes generales debido a que dos terceras partes de las muestras procesadas provenían de esta fuente.

Las muestras con DNA no amplificable también provenían de SLP y tuvieron rendimientos de menos 100 ng de DNA total. A partir de estos resultados decidimos que para la detección rutinaria de HPV con el método descrito emplearemos muestras de raspados cervicovaginales que rindan al menos 100 ng de DNA para poder tipificar los virus además de detectar su presencia.

Algoritmo para la tipificación de HPV-AR

El algoritmo que desarrollamos en este trabajo para tipificar los HPV-AR en las mujeres infectadas se muestra en la Fig. 10.

El producto de PCR de ~250 pb obtenido con los oligonucleótidos pU 1M/2R es digerido con diferentes enzimas de restricción (*Ava* II, *Rsa* I, *Bgl* II, *Ava* I, *Acc* I) para conocer el tipo o tipos de VPH-AR presentes en la muestra en la que ha podido ser amplificado. Mediante la digestión de los productos de PCR de ~250 pb pueden ser identificados siete de los tipos de HPV-AR más frecuentes.

La primera enzima de restricción con la que debe ser probada cada muestra positiva es *Ava* II que permite identificar tres tipos de HPV-AR entre los cuales se encuentran los dos más comunes (16 y 18) así como el tipo 33 (ejemplo en la Fig. 11). Si la muestra es cortada con esta enzima, los patrones de restricción permiten identificar el tipo correspondiente (Tabla 4).

Si la banda principal de una muestra no es afectada o no desaparece por completo con *Ava* II, se procede a incubarla en diferentes mezclas de digestión con cada una de las cuatro enzimas restantes.

Rsa I permite identificar el tipo 31, *Bgl* II el tipo 52, *Ava* I el tipo 35 y *Acc* I el tipo 58 (ejemplo en la Fig. 12). Los patrones de polimorfismos en la longitud de

los fragmentos de restricción para los tipos de HPV identificados con esta técnica se muestran en la Tabla 4.

Tipos de HPV-AR circulantes en San Luis Potosí y Guanajuato

Las muestras que amplificaron productos de ~250 pb y luego analizamos por RFLP fueron 331: 212 de la ciudad de SLP y 119 de Guanajuato (Tabla 8). En ambos estados el tipo viral con mayor frecuencia general fue HPV16 (60.5%) que predominó en SLP (62.6 %) sobre Guanajuato (56.4%). El segundo tipo viral en orden de frecuencia general en ambos estados fue HPV-31 (13.4%) que predominó en Guanajuato (16.4%) sobre SLP (11.9%). El tercer lugar en frecuencia general fue HPV-18 (10.3%) con proporciones similares en SLP (10.4%) y Guanajuato (10.0%).

En SLP encontramos otros tipos de HPV-AR con frecuencias menores (HPV-52, 6.3%; HPV-35, 5.9%; HPV-58, 1.5%; HPV-33, 1.1%). En Guanajuato encontramos el tipo 52 en el 7.9%, el tipo 35 en el 5.0% y el tipo 33 en el 2.1% de las muestras.

Las frecuencia general de las infecciones “únicas” (i.e., por un solo tipo viral) fue mayor (77.6%) que la frecuencia general de las infecciones “múltiples” (i.e., por dos o más tipos virales) (22.3%). La frecuencia de las infecciones únicas fue sensiblemente menor en SLP (75.0%) que en Guanajuato (82.3%) (Tabla 9).

El orden descendente de frecuencia de los tipos virales identificados en las infecciones únicas fue similar al orden observado en la frecuencia general. Los tipos virales más frecuentes en las infecciones únicas fueron el 16 (72.0%), el 18 (10.1%) y el 31 (10.1%), pero sus frecuencias fueron diferentes en SLP (77.4, 9.4 y 8.2%) y Guanajuato (63.3, 11.2 y 13.3%) (Tabla 10).

En SLP encontramos otras infecciones únicas con tipos de HPV-AR con frecuencias menores (HPV-52, 2.5%; HPV-33, 1.3%; HPV-35, 0.6%; HPV-58, 0.6%). En Guanajuato encontramos el tipo 52 en el 5.1%, el tipo 35 en el 2.0% y el tipo 33 en el 2.0% de las muestras.

Las frecuencias generales de los tipos de HPV circulantes fueron similares a las frecuencias de los tipos de HPV en las infecciones únicas debido a que estas predominan en SLP (75.0%) y Guanajuato (82.3%).

Infecciones múltiples

Al tipificar las muestras con enzimas de restricción identificamos casos con más de un tipo de HPV-AR (Tabla 9).

Detectamos la presencia simultánea de dos y tres tipos de HPV-AR en el 22.6% y 2.4% de las muestras de SLP respectivamente, mientras que solamente pudimos identificar dos tipos de HPV-AR en el 17.7% de las muestras de Guanajuato.

Entre las infecciones con dos tipos de HPV-AR también fue más frecuente el tipo 16 (42.0 %), con proporciones similares en SLP (42.7%) y Guanajuato (40.5%). El segundo tipo más frecuente fue HPV-AR 31 (18.8%) tanto en SLP (16.7%) como en Guanajuato (23.8%). El tercer lugar en SLP fue ocupado por el tipo 18 (12.5%) y por el tipo 52 en Guanajuato (14.3%). Los siguientes lugares fueron ocupados en SLP fueron ocupados por el tipo 52, 35, 58 y 33 (con 11.5%, 11.5%, 3.1% y 1.0% respectivamente) y en Guanajuato por el tipo 35, 18 y 33 (11.9%, 7.1% y 2.4%) (Tabla 11).

En las infecciones dobles los tipos de HPV-AR que se encontraron asociados con mayor frecuencia en SLP fueron 16/31 (29.2%), 16/52 (18.8%), 16/35 (14.6%) y 16/18 (14.6%); en Guanajuato 16/31 (38.1%), 16/52 (19.1%) y 16/35 (14.3%) (Tabla 12).

En los cinco casos de infecciones triples identificamos el tipo 16, seguido por los tipos 31, 35 y 52 en tres casos y el tipo 18 en un caso.

DISCUSIÓN

En México el CaCu representa un grave problema de salud pública, tanto por su morbilidad como por la alta mortalidad en mujeres jóvenes (Mohar et al. 1998). En el país contamos con bastantes datos sobre la prevalencia general de la infección del cérvix por HPV (Palacio-Mejía et al. 2003, Muñoz 2000, Torroella-Kouri et al. 1998), pero la información sobre los tipos de HPV de alto riesgo en las mujeres mexicanas es escasa y generalmente regional (González-Losa et al., 2004; Muñoz, 2000) o ha sido dirigida a identificar solamente los tipos 16 y 18 (Hernández et al. 1997, Berumen et al. 1995).

Para la detección del DNA de HPV mediante amplificación por PCR es necesario contar con muestras del cérvix que contengan DNA de calidad y en cantidad suficiente. Con los procesos de extracción y cuantificación del DNA de raspados del cérvix con cytobrush empleados en nuestro laboratorio obtenemos DNA de suficiente calidad y en cantidad suficiente (≥ 100 ng, necesarios para llevar a cabo la detección y tipificación de HPV) en la gran mayoría (98.6%) de las muestras. Observamos variación en la cantidad de DNA total obtenida quizás debido principalmente a que las muestras fueron tomadas por diferentes personas.

Los resultados del presente trabajo constituyen una primera aproximación al conocimiento de la epidemiología molecular de la infección por HPV en el centro del país, ya que nos han permitido conocer la frecuencia de la infección del cérvix por HPV en general y por los diferentes tipos de HPV-AR —mediante la amplificación del DNA de HPV por PCR seguida del análisis de los fragmentos de restricción— en un grupo significativo de mujeres con lesiones premalignas de alto y bajo grado y CaCu invasor que radican en los estados vecinos de San Luis Potosí y Guanajuato.

La amplificación del DNA de HPV-AR fue realizada mediante PCR anidada con parejas de oligonucleótidos universales que en la primera reacción amplifican un producto de ~650 pb de la región LCR/E7 y en la reacción anidada un producto

de ~250 pb de los genes E6/E7 (Noda et al. 1998, Fujinaga et al. 1992). Para identificar los tipos de HPV-AR utilizamos el método de análisis del polimorfismo de los fragmentos de restricción (RFLP) de los productos de ~250 pb propuesto por Fujinaga et al. (1992). Las muestras negativas a este método fueron analizadas con otra pareja de oligonucleótidos universales que amplifican un fragmento de ~450 pb de la región L1 de tipos de HPV de alto y bajo riesgo (Manos et al. 1989).

La detección específica de HPV-AR es de suma importancia en el seguimiento de pacientes con infección persistente, en las cuales hay que determinar la progresión o regresión de las lesiones del cérvix. Diversos estudios demuestran cómo se puede predecir el riesgo de desarrollar lesiones neoplásicas intraepiteliales del cérvix (NIC) cuando hay infección por ciertos tipos de HPV (Garland 2002). La mayoría de los HPV genitales de alto y bajo riesgo están asociados a lesiones leves (NIC I), pero los tipos virales asociados a lesiones moderadas (NIC II) y severas (NIC III) son clasificados como HPV-AR, entre los cuales se encuentran HPV-16, -18, -31 y otros (González Sánchez et al. 2002).

Prácticamente todas las mujeres incluidas en nuestro estudio (98.6%) estaban infectadas por HPV y en la gran mayoría de ellas (89.5%) identificamos HPV-AR. La proporción de mujeres infectadas por HPV-AR podría ser incluso algo mayor a la calculada debido a que en el 8.4% de los casos no pudimos tipificar los virus porque las muestras correspondientes resultaron negativas para el producto de la región E6/E7 pero positivas para la región L1, que incluye tipos de bajo y alto riesgo.

De los ocho tipos de HPV-AR más frecuentemente asociados a los carcinomas del cérvix (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -45, -52 y -58), los cuales son responsables del 95% de los casos de cáncer invasor en el mundo (Muñoz et al. 2003), el método de Fujinaga et al. (1992) empleado por nosotros en este trabajo permite identificar siete tipos excepto el HPV-45.

Entre los 370 casos incluidos en este trabajo identificamos 410 infecciones por HPV-AR que pudimos tipificar en el 99% de los casos. Entre las mujeres de SLP identificamos infecciones por los siete tipos de HPV-AR que permite tipificar el

método empleado, mientras que entre las mujeres de Guanajuato identificamos seis tipos, entre los cuales estuvo ausente el HPV-58.

Las frecuencias de la infección general por HPV y por los tipos de alto riesgo identificados por nosotros son similares a las obtenidos en México y otras poblaciones con alta incidencia de CaCu (Muñoz 2000, Wright et al. 2000, Torroella-Kouri et al. 1998). El tipo de HPV-AR más frecuente en los dos estados incluidos en este estudio es HPV-16. También en ambos estados la frecuencia para los tipos HPV-31, -18, -52 y -35 es similar. En SLP las frecuencias más bajas correspondieron a HPV-58 y -33 mientras que en Guanajuato sólo identificamos HPV-33.

La frecuencia de HPV-16 encontrada por nosotros (60.8%) es mayor que la mundial (53%) calculada por Muñoz (2000). En contraste, la frecuencia de HPV-18 que encontramos es ligeramente menor (10.1%) que la mundial (15%) calculada por la misma autora (Muñoz 2000). La frecuencia de HPV-33 observada por nosotros (1%) es mucho menor que la recientemente calculada para América Central (11.8%) por Clifford et al. (2005), en tanto que las frecuencias de HPV-31 y -35 que encontramos son mayores que las descritas para América Latina (Muñoz et al. 2003).

El método de tipificación empleado nos permitió identificar una proporción considerable de infecciones por dos tipos virales (SLP, 22.6%; Gto 17.7%) y una menor proporción por tres tipos virales (SLP, 2.4%). En estas infecciones múltiples HPV-16 también resultó el tipo más frecuente.

Entre las infecciones dobles la frecuencia de los tipos de HPV-AR observados es, en orden descendente, HPV-16, -31, -35, -52, -18, -58 y -33. En las infecciones triples es HPV-16, -31, -35 y -52.

La proporción de infecciones múltiples podría ser algo mayor a la calculada por nosotros debido a que el método empleado no permite identificar todos los tipos de HPV de bajo y alto riesgo. Sin embargo, la proporción de infecciones múltiples por los tipos virales faltantes probablemente no difiere considerablemente de los porcentajes encontrados, ya que si bien entre las lesiones de bajo grado (NIC I) pueden encontrarse prácticamente todos los tipos de HPV genitales, en las lesiones de alto grado (NIC II y NIC III) prácticamente sólo se

encuentran tipos de alto riesgo, entre los cuales los identificados por nosotros son los más frecuentes (Garland 2002).

La proporción de infecciones múltiples determinada en este estudio (20.8%) es más del doble que la mundial (8.1%) calculada por Muñoz et al. (2003). Entre las infecciones por dos tipos de HPV identificadas por nosotros, el 13% contiene la pareja de HPV-AR 16/18, cuya frecuencia es más de seis veces mayor que la proporción mundial (1.8%) estimada recientemente por Clifford et al. (2005).

Las infecciones por dos o más tipos de HPV tienen implicaciones importantes como marcador de enfermedad persistente, lesiones cervicales múltiples y progresión de lesiones precancerosas de bajo grado a lesiones de alto grado (Becker et al. 1994). Hay escasa evidencia de interacciones moleculares directas entre los diferentes tipos de HPV para potenciar la patogénesis del CaCu y no se sabe si ciertos tipos de HPV específicos pueden promover o excluir la infección por otros tipos específicos. El seguimiento cuidadoso de las infecciones múltiples podría ayudar a identificar factores del huésped importantes para la progresión de la enfermedad (Hubbard 2003).

HPV-16 es el tipo que infecta a las mujeres de los estados de SLP y Guanajuato analizadas más frecuentemente tanto en las infecciones únicas como en las múltiples, igual que en el resto del país y a nivel mundial (Muñoz et al. 2003, Muñoz 2000). Diversos autores han concluido que HPV-16 es el tipo más persistente (Richardson et al. 2003, Molano et al. 2003, Londesborough et al. 1996) y por lo tanto las mujeres infectadas con este tipo tienen mayor riesgo de desarrollar lesiones preneoplásicas severas (Woodman et al. 2001).

Este trabajo deja bien claro que el método de tipificación empleado por nosotros tiene utilidad diagnóstica para identificar a las mujeres infectadas con HPV-AR y en especial con HPV-16, que necesitan tratamiento y vigilancia más estrecha. La tipificación también permite detectar variaciones geográficas en la distribución de los genotipos virales, que reflejan tanto el comportamiento endémico de los diversos tipos de HPV en poblaciones específicas como las condiciones ambientales locales o genéticas de los huéspedes que pueden favorecer o retrasar la aparición de determinadas lesiones (Hildesheim y Wang 2002).

Además de proporcionar información sobre el riesgo individual de cada paciente y en estudios epidemiológicos, la tipificación de HPV-AR es esencial en los estudios para el desarrollo y uso de vacunas, ya que es muy cuestionable la vacunación contra un tipo específico de HPV en poblaciones en las cuales se desconoce la prevalencia de los tipos virales circulantes (Corona-Gutiérrez et al. 2004, Garland 2002, Williams et al. 2002).

REFERENCIAS

- Alonso de Ruiz P, Lazcano Ponce E, Hernández Ávila M. Cáncer cervicouterino. Diagnóstico, prevención y control. Primera reimpression. Médica Panamericana. México, 2004.
- Arrossi S, Sankaranarayanan R, Parkin DM. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Publica Mex* 45 (supl 3):S306-S314, 2003.
- Becker TM, Wheeler CM, McGough NS, Parmenter CA, Jordan SW, Stidley CA, McPherson RS, Dorin MH. Sexually transmitted diseases and other risk factors for cervical dysplasia among southwestern Hispanic and non-Hispanic white women. *JAMA* 271:1181–1188, 1994.
- Berumen J, Unger RE, Casas L, Figueroa P. Amplification of human papillomavirus types 16 and 18 in invasive cervical cancer. *Hum Pathol* 26:676-681, 1995.
- Berumen J, Ordoñez RM, Lazcano-Ponce E, Salmerón J, Galván SC, Estrada RA. Asian American variants of human papillomavirus 16 and risk for cervical cancer: a case-control study. *J Natl Cancer Inst* 93:1325-1330, 2001.
- Bosch FX, Manos MM, Muñoz 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. *J Natl Cancer Inst* 87:796-802, 1995.
- Chin-Hong P, Klausner JD. Diagnostic tests for HPV infection. *MLO Med Lab Obs* 36:10-2, 14-6, 2004.
- Clifford GM, Rana KR, Franceschi S, Smith JS, Gough G, Pimenta JM. Human papillomavirus genotype distribution in low-grade cervical lesions: Comparison by geographic region and with cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:1157-1164, 2005.
- Corona Gutiérrez, CM, Tinoco A, Navarro T, Contreras ML, Cortés RR, Calzado P, Reyes L, Posternak R, Morosoli G, Verde ML, Rosales R. Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus.

- Hum Gene Ther 15:421-431, 2004.
- De Roda AM, Walboomers JMM, van den Brule AJC, Meijer CJ, Snijders PJE. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 76:1057, 1995.
- de Villiers E-M. Taxonomic classification of papillomaviruses. *Papillomavirus Rep* 12:57-63, 2001.
- Fujinaga Y, Shimada M, Okasawa K, Fukushima M, Kato I, Fujinaga K. Simultaneous detection and typing of genital human papillomavirus using the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 72:1039-1044, 1991.
- Garland SM. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. *Pathology* 34:213–224, 2002.
- González-Losa MR, Rosado-López I, Valdez-González N, Puerto-Solís M. High prevalence of human papillomavirus type 58 in Mexican colposcopy patients. *J Clin Virol* 29:202-205, 2004.
- González Sánchez JL, Chávez Brambila J, Hernández Hernández DM, Martínez Sánchez S, García Carrancá A. High and low risk human papillomavirus virus infection in women with CIN: differential characteristics. *Ginecol Obstet Mex* 70:11–16, 2002.
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 38:357-361, 2000.
- Hernández AM, Lazcano PEC, Berumen CJ, Cruz VA, Alonso de Ruiz PP, González LG. Human papillomavirus 16-18 infection and cervical cancer in Mexico: A case control study. *Arch Med Res* 28: 265-271, 1997.
- Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res* 89:229–240, 2002.
- Hubbard RA. Human papillomavirus testing methods. *Arch Pathol Lab Med* 127:940-946, 2003.
- Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr* 31:80-88, 2003.

- Lazcano-Ponce E, Moss S, Alonso de Ruiz P, Salmerón CJ, Hernández AM. Cervical cancer screening in developing countries: Why is it ineffective? The case of Mexico. *Arch Med Res* 30:240-250, 1999.
- Lazcano-Ponce E, Herrero R, Munoz N, Cruz A, Shah KV, Alonso P, Hernández P, Salmerón J, Hernández M. Epidemiology of HPV infection among Mexican women with normal cervical cytology. *Int J Cancer* 91:412-420, 2001.
- Lewis, MJ. Análisis de la situación del cáncer cervicouterino en América Latina y el Caribe. Organización Panamericana de la Salud. Washington. 2004.
- Londesborough P, Ho L, Terry G, Cuzick 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* 69:364–368, 1996.
- López–Revilla R, Lomelí–Forcada A, Sánchez–Garza M, Martínez–Contreras LA, Rojas–Hernández R, Quintana–Vargas S, Ramírez–Barba HJ. Epidemiología de las lesiones preneoplásicas y malignas del cérvix en el estado de Guanajuato, 2000-2003. Informe técnico.
- Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 7:209-214, 1989.
- Mas-Oliva, Jaime. Diagnóstico molecular en medicina. Primera edición. Manual Moderno. México, 2004.
- Mohar A, Frías M, Suchil L, Macías C, Tapia R. Epidemiology of cervical cancer in Mexico. *Annals Oncol* 7 (supl 4):S222-S227, 1998.
- Molano M, van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, Meijer CJ, Munoz N, Franceschi S; HPV Study Group. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol* 158:486–494, 2003.
- Monk BJ, Cook N, Ahn C, Vasilev SA, Berman ML, Wilczynski SP. Comparison of the polymerase chain reaction and Southern blot analysis in detecting and

- typing human papillomavirus virus deoxyribonucleic acid in tumors of the lower female genital tract. *Diagn Mol Pathol* 3:283–291, 1994.
- Muñoz N, Bosch X, De Sanjosé S, Vergara A, del Moral A, Munoz MT, Tafur L, Gili M, Izarzugaza I, Viladiu P. Risk factor for cervical intraepithelial neoplasia grade III/ carcinoma *in situ* in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2:423-431, 1993.
- Muñoz N. Human papillomavirus and cancer: the epidemiological evidence. *J Clin Virol* 19:1-5, 2000.
- Muñoz N, Bosch X, De San José S, Herrero R, Castellsagué 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* 348:518-527, 2003.
- Nassiell K, Nasiell M, Vaclavinkova V. Behavior of moderate dysplasia during long-term follow up. *Obstet Gynecol* 61:609-614, 1983.
- Nassiell K, Roger B, Nasiell M. Behavior of mild cervical dysplasia during a long-term follow-up. *Obstet Gynecol* 67:665-669, 1986.
- 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* 26:165-169, 1998.
- Palacio-Mejía LS, Rangel-Gómez G, Hernández-Ávila M, Lazcano-Ponce E. Cervical Cancer, a disease of poverty: Mortality differences between urban and rural areas in Mexico. *Salud Publica Mex* 45 (supl 3):S315-S325, 2003.
- Palefsky JM, Holly EA. Molecular virology and epidemiology of human papillomavirus and cervical cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent* 4:518-527, 1995.
- Pisani P, Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int J Cancer* 83:18-29, 1999.
- Pisani, P., Bray, F. & Parkin, D. M. Estimates of the worldwide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer* 97:72–81, 2002.
- Ponten J, Guo Z. Pre-cancer of the human cervix. *Cancer Surv* 32:201-29, 1998.

- Reeves WC, Brinton LA, García M, Brenes NN, Herrero R, Gaitán E, Tenorio F, de Britton RC, Rawls WE. Human papillomavirus infection and cervical cancer in Latin America. *N Engl J Med* 320:1437-1441, 1989.
- Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, Coutlee F, Franco EL. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:485–490, 2003.
- Richart RM. Cervical intraepithelial neoplasia. *Pathol Annu* 8:301-328, 1973
- Rosales-Ortuño L, Rodríguez-Nieto MT, López-Revilla R. An outbreak of cervical cancer in San Luis Potosí, Mexico. En: Monsonego J (ed) *Proceedings of the 5th International Multidisciplinary Congress Eurogin 2003, Preventing and Controlling Cervical Cancer in the New Millenium*. Monduzzi Editore, Boloña, pp 341-344.
- Schiffman MH, Bauer HM, Lorincz AT, Manos MM, Byrne JC, Glass AG, Cadell DM, Howley PM. Comparison of Southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol* 29:573–577, 1991.
- Shiffman MH, Bauer HM, Hoover RN. Epidemiologic evidence showing that human papilloma virus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst* 85:958-964, 1993.
- Soe MN. Screening for cervical cancer in developing countries. *Br Med J* 304:534-535, 1992.
- Syrjanen K, Mantyjarvi R, Saarikoski S, Vayrinen M, Syrjanen S, Parkkinen S, Yliskoski M, Saasetamoinen J, Castren O. Factors associated with progression of cervical human papillomavirus infections into carcinoma *in situ* during long term propective follow-up. *Br J Obstet Gynecol* 95:1096-1102, 1988.
- Ting Y, Manos MM. Detection and typing of genital human papillomaviruses. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. San Diego: Academic Press 1990:356-367.

- Torroella M, Morsberger S, Carrillo A, Mohar A, Meneses A, Ibarra M Daniel RW, Ghaffari AM, Solorza G, Shah KV. HPV prevalence among Mexican women with neoplastic and normal cervixes. *Gynecol Oncol* 70:115-120, 1998.
- Volkow P, Rubí S, Lizano M, Carrillo A, Vilar-Compte D, García-Carranca A, Sotelo R, García B, Sierra-Madero J, Mohar A. High prevalence of oncogenic human papillomavirus in the genital tract of women with human immunodeficiency virus. *Gynecol Oncol* 82:27-31, 2001.
- Walboomers J, Jacobs M, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 189:12-19, 1999.
- Williams OM, Hart KW, Wang EC, Gelder CM. Analysis of CD4(1) T-cell responses to human papillomavirus (HPV) type 11 L1 in healthy adults reveals a high degree of responsiveness and cross-reactivity with other HPV types. *J Virol* 76:7418–7429, 2002.
- Wright TC, Jr., Denny L, Kuhn L, Pollack A, Lorincz A. HPV DNA testing of self-collected vaginal samples compared with cytologic screening to detect cervical cancer. *JAMA* 283: 81-86, 2000.
- Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, Yates M, Rollason TP, Young LS. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 357:1831–1836, 2001.
- Yoshikawa H, Kawana T, Kitagawa K, Mizuno M, Yoshikura H, Iwamoto A. Detection and typing of multiple genital human papillomaviruses by DNA amplification with consensus primers. *Jpn J Cancer Res* 82:524-531, 1991.
- zur Hausen H. Human papillomavirus and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol* 78: 1-8, 1977.
- zur Hausen H. Papillomavirus in human cancers. *Mol Carcinog* 1:147-150, 1988.

Tabla 1. Parejas de oligonucleótidos empleadas

Pareja	Oligonucleótidos			Región/gen amplificado	Tamaño del producto	Tm (°C)	MgCl ₂ ^a
	Nombre	Secuencia (5'→3')	Posición ^b				
1	pU 1M	TGTCAAAAACCGTTGTGTCC	419	E6/E7	~250 pb	63.4	2.5 mM
	pU 2R	GAGCTGTCGCTTAATTGCTC	656			61.6	
2	LCRS	AAGGGAGTAACCGAAAACGGT	26	LCR/E7	~650 pb	57.7	2.5 mM
	E7AS	TCATCCTCCTCCTCTGAG	671			64.5	
3	MY09	CGTCCMARRGGAWACTGATC	6584	L1	~450 pb	56.0	2.5 mM
	MY11	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG	7035			58.4	
4	PCO4	CAACTTCATCCACGTTCAACC	---	β-globina	~260 pb	64.2	5.0 mM
	GH20	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	---			60.3	

^aConcentración empleada en las mezclas de PCR

^bNucleótido del genoma de VPH16 al que se une el extremo 5' de cada oligonucleótido

Tabla 2. Contenido de las mezclas de PCR (50 μ l)

Componente	μl	Concentración
Agua	32.2	--
Buffer PCR 10 \times	5.0	1 \times ^a
MgCl ₂ 50 mM	2.5	2.5 mM
Mezcla de dNTP's (10 mM c/u)	2.0	0.4 mM c/u
Mezcla de oligonucleótidos (10 μ M c/u)	3.0	0.6 μ M c/u
<i>Taq</i> DNA polimerasa (5 U/ml)	0.3	1.5 U
DNA problema (10 ng/ml)	2.5	25 ng

^aTris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8.4

Tabla 3. Amortiguadores para las enzimas de restricción

Enzima	Amortiguador	
	Nombre	Composición
<i>Ava</i> II, <i>Ava</i> I	NE Buffer 4 ^a	Tris-ac 20 mM, KAc 50 mM, MgAc 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9
<i>Bgl</i> II	NE Buffer 3 ^a	Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, MgCl ₂ , 10 mM, DTT 1 mM, pH 7.9
<i>Rsa</i> I, <i>Acc</i> I	React 1 ^b	Tris-HCl 50 mM, MgCl ₂ 10 mM, pH 8.0

^aBiolabs

^bInvitrogen

Tabla 4. Tamaños de los productos E6/E7 ~250 pb de diversos tipos de HPV^a y de los fragmentos generados con enzimas de restricción^b

Enzima	Tipo de HPV						
	16	18	31	33	35	52b	58
Longitud total (pb)	238	268	232	244	232	231	244
<i>Ava</i> II	157/81	172/96	NC	136/108	NC	NC	NC
<i>Rsa</i> I	NC	NC	117/115	NC	NC	NC	NC
<i>Ava</i> I	NC	NC	NC	NC	186/46	NC	NC
<i>Bgl</i> II	NC	NC	NC	NC	NC	176/55	NC
<i>Acc</i> I	NC	NC	NC	NC	NC	NC	126/118

^aAmplificados con la pareja de oligonucleótidos pU 1M/pu 2R

^bTomado de Hwang et al., 1999

NC, no corta

Tabla 5. DNA obtenido de las 370 muestras cervicales incluidas en este trabajo

$\mu\text{g DNA}$	n	%
< 0.09	5	1.4
0.10-0.49	41	11.1
0.50-0.99	44	11.9
1.00-1.99	85	23.0
2.00-4.99	114	30.8
5.00-9.99	17	4.6
10.00-14.99	8	2.2
15.00-19.99	23	6.2
20.00-24.99	15	4.0
> 25.00	18	4.9

Tabla 6. Amplificación del producto E6/E7 ~250 pb de 30 muestras mediante PCR directa y anidada

PCR	Casos E6/E7+	
	n	%
Directa ^a	11	36.7
Anidada ^b	24	80.0

^aOligonucleótidos pU 1M/2R

^bOligonucleótidos LCRS/E7AS y pU 1M/pU 2R

Tabla 7. DNA amplificable y productos de HPV en las muestras

Tipo de muestra	Total		SLP		Gto	
	N	%	n	%	n	%
Totales y por estado	370	100	250	100	120	100
Con DNA amplificable	365	98.6	245	98.0	120	100
HPV-AR (<i>E6/E7+</i>)	331	89.5	212	84.8	119	99.2
HPV-AR/BR (<i>E6/E7-, L1+</i>)	31	8.4	30	12.0	1	0.8
Sin HPV (<i>E6/E7-, L1-, β-globina+</i>)	3	0.8	3	1.2	0	0
Con DNA no amplificable (<i>E6-, L1-, β-globina-</i>)	5	1.4	5	2	0	0

Tabla 8. Frecuencia de los tipos de HPV-AR en las mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato

Tipo	Total		SLP		Gto	
	n	%	n	%	n	%
16	248	60.5	169	62.6	79	56.4
31	55	13.4	32	11.9	23	16.4
18	42	10.3	28	10.4	14	10
52	28	6.8	17	6.3	11	7.9
35	23	5.6	16	5.9	7	5
33	6	1.5	3	1.1	3	2.1
58	4	1.0	4	1.5	0	0
NI	4	1.0	1	0.4	3	2.1
Totales	410	100.0	270	100.0	140	100.0

NI, no identificado

Tabla 9. Frecuencia de las infecciones únicas y múltiples por HPV-AR en las mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato

Infección	Total		SLP		Gto	
	n	%	n	%	n	%
Única	257	77.6	159	75	98	82.3
Doble	69	20.8	48	22.6	21	17.7
Triple	5	1.5	5	2.4	0	0
Casos totales	331	100.0	212	100.0	119	100.0

Tabla 10. Frecuencia de los tipos de HPV-AR en las mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato con infecciones únicas

Tipo	Totales		SLP		Gto	
	n	%	n	%	n	%
16	185	72.0	123	77.4	62	63.3
18	26	10.1	15	9.4	11	11.2
31	26	10.1	13	8.2	13	13.3
52	9	3.5	4	2.5	5	5.1
33	4	1.6	2	1.3	2	2.0
35	3	1.2	1	0.6	2	2.0
58	1	0.4	1	0.6	0	0
NI	3	1.2	0	0	3	3.1
Totales	257	100.0	159	100.0	98	100.0

Tabla 11. Frecuencia de los tipos de HPV-AR en las mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato con infecciones dobles

Tipo de HPV	Total		SLP		Gto	
	n	%	n	%	n	%
16	58	42.0	41	42.7	17	40.5
31	26	18.8	16	16.7	10	23.8
52	17	12.3	11	11.5	6	14.3
35	16	11.6	11	11.5	5	11.9
18	15	10.9	12	12.5	3	7.1
58	3	2.2	3	3.1	0	0
33	2	1.5	1	1.0	1	2.4
NI	1	0.7	1	1.0	0	0
Totales	138	100.0	96	100.0	42	100.0

NI, no identificado

Tabla 12. Frecuencia de los tipos de HPV en las mujeres de San Luis Potosí y Guanajuato con infecciones dobles y triples

Infecciones	Tipos de HPV	Total		SLP		Gto	
		n	%	n	%	n	%
Dobles	16/18	9	13.0	7	14.6	2	9.5
	16/31	22	31.9	14	29.2	8	38.1
	16/33	1	1.5	1	2.1	---	---
	16/52	13	18.8	9	18.8	4	19.1
	16/35	10	14.5	7	14.6	3	14.3
	16/58	3	4.3	3	6.3	---	---
	18/35	2	2.9	2	4.2	---	---
	18/31	2	2.9	1	2.1	1	4.8
	18/52	1	1.5	1	2.1	---	---
	18/?	1	1.5	1	2.1	---	---
	31/33	1	1.5	--	---	1	4.8
	31/35	1	1.5	1	2.1	---	---
	35/52	3	4.3	1	2.1	2	9.5
Triples	16/31/52	2	4.0	2	4.0	---	---
	16/18/35	1	2.0	1	2.0	---	---
	16/31/35	1	2.0	1	2.0	---	---
	16/35/52	1	2.0	1	2.0	---	---

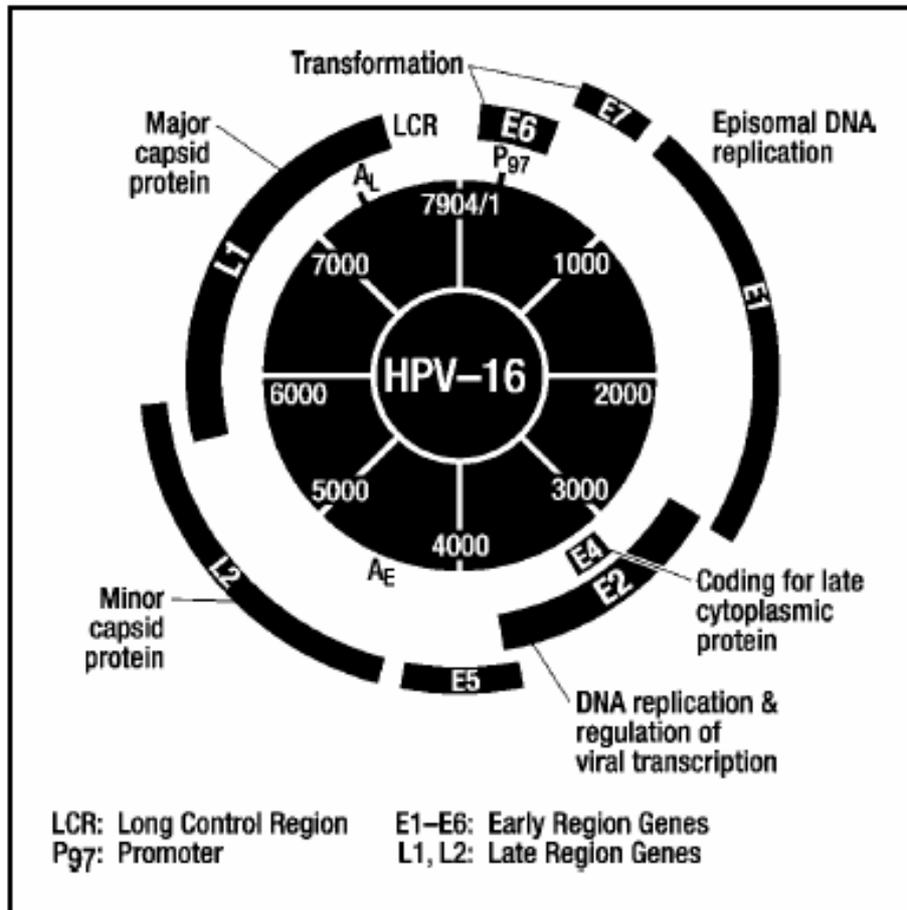


Fig. 1. Genoma de HPV16. Consiste en DNA circular de doble cadena de 7,904 pares de bases, constituido por ocho genes (tempranos y tardíos) y una región regulatoria no codificante con sitios de unión para factores proteínicos y hormonales del hospedero necesarios para que el virus pueda completar su ciclo de replicación. Hay seis genes tempranos (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) y dos tardíos (L1 y L2). Los primeros codifican proteínas involucradas en la replicación y la regulación de la expresión y en la oncogenicidad viral. Los genes tardíos codifican las proteínas estructurales que conforman la cápside viral. (Tomado de Hubbard 2003).

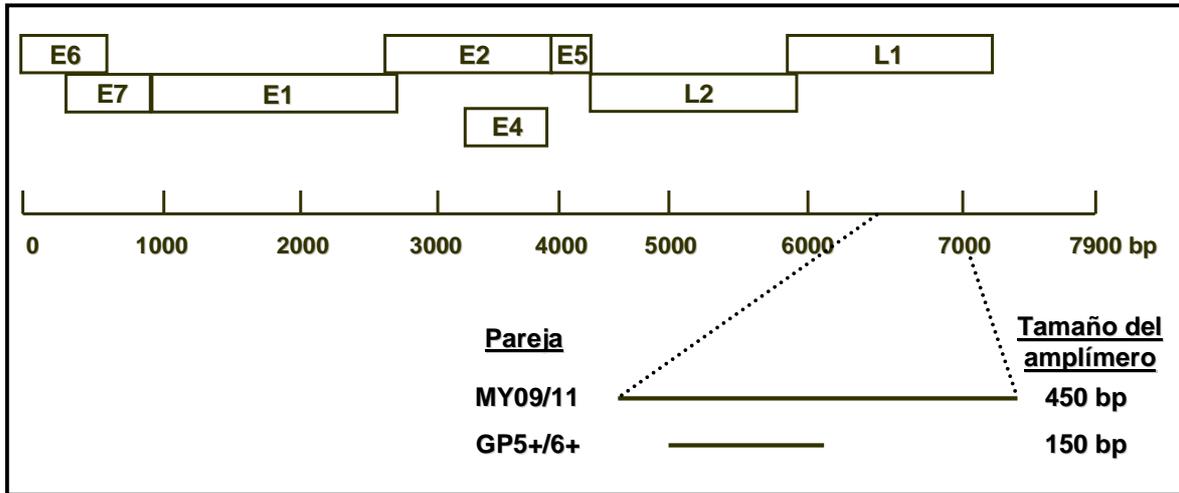
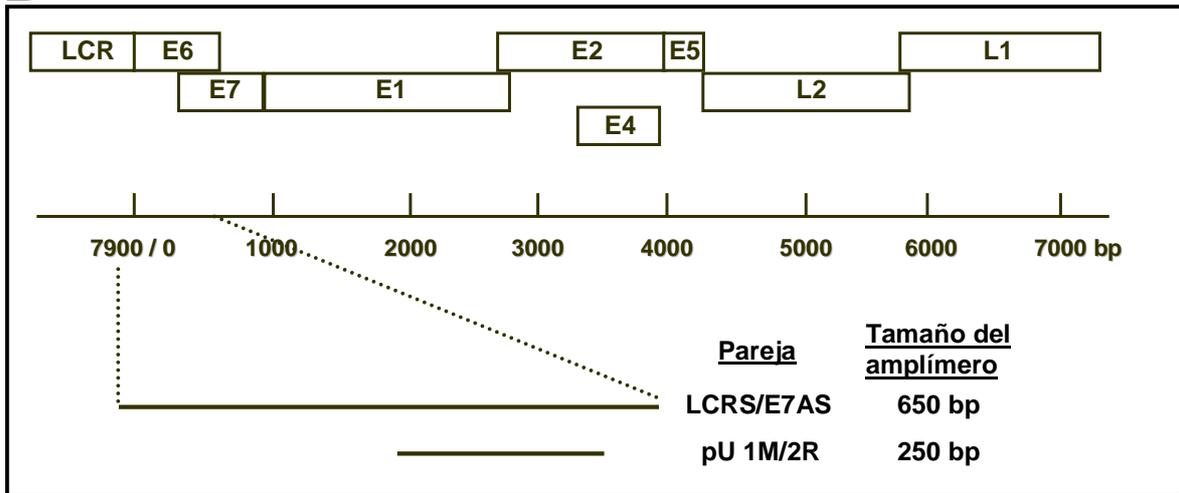
A**B**

Fig. 2. Localización y productos de PCR de los oligos consenso MY09/11, GP5+/6+, LCRS/E7AS y pU 1M/2R en el genoma de HPV16. (A) Las parejas de oligonucleótidos MY09/11 y GP5+/6+ amplifican fragmentos del gen L1: uno mayor de ~450 pb, y otro menor de ~150 pb, cuya secuencia está incluida en el primero. El amplicón generado por los oligonucleótidos MY09/11 abarca del nucleótido 6584 al 7035 (~450 pb) y el generado por los oligos GP5+/6+ abarca del nucleótido 6625 al 6766 (~150 pb). (B) Las parejas de oligonucleótidos LCRS/E7AS y pU 1M/2R amplifican fragmentos de los genes E6 y E7: uno mayor de ~650 pb y otro menor de ~250 pb cuya secuencia está incluida en el primero. Los oligos LCRS/E7AS además amplifican una pequeña porción de la región LCR. El amplicón generado por los oligos LCRS/E7AS abarca del nucleótido 26 al 671 (~650 pb) y el generado por los oligos pU 1M/2R abarca del nucleótido 419 al 656 (~250 pb).

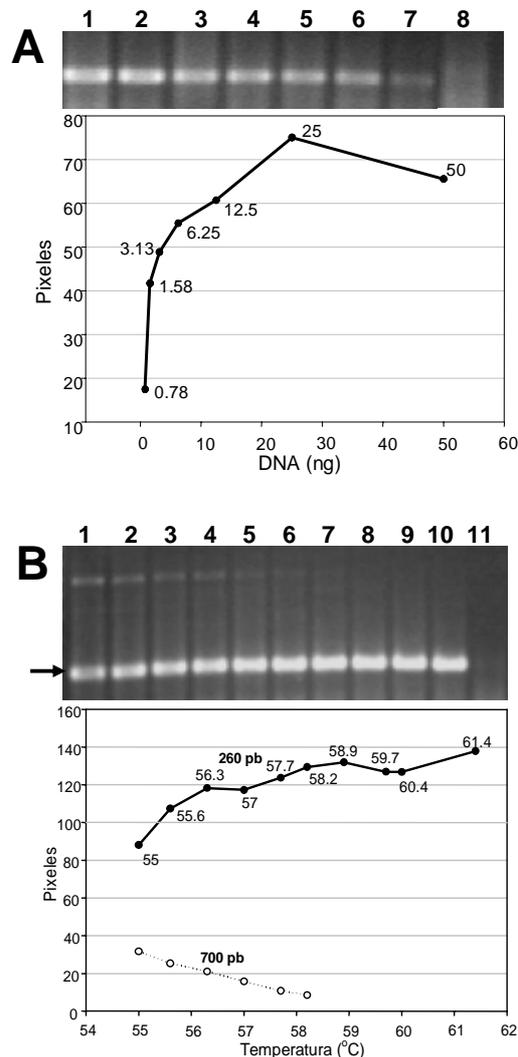


Fig. 3. La amplificación del gen de β -globina depende del contenido de DNA y la temperatura de alineación. (A) Electroforesis en agarosa al 1.5% de mezclas de PCR con cantidades decrecientes de DNA (50-0.78 ng) de la muestra 001. Carriles 1, 50 ng; 2, 25 ng; 3, 12.5 ng; 4, 6.25 ng; 5, 3.13 ng; 6, 1.56 ng; 7, 0.78 ng; 8, sin DNA (agua); y relación del contenido de DNA de la muestra con la fluorescencia (píxeles) de la banda principal medidas con el programa Quantity One (BioRad). (B) Electroforesis en agarosa al 1.5% de mezclas de PCR con temperaturas crecientes de alineación (55°-61.4°) y 6.25 ng de DNA de la muestra 001. La banda principal amplificada (~260 pb) está marcada con la flecha de la izquierda. Carriles 1, 55°C; 2, 55.6°C; 3, 56.3°C; 4, 57°C; 5, 57.7°C; 6, 58.2°C; 7, 58.9°C; 8, 59.7°C; 9, 60.4°C; 10, 61.4°C; 11, 55°C sin DNA (agua); y relación del incremento de la temperatura de alineación en las mezclas de PCR con la fluorescencia (píxeles) de la banda principal. Nótese la presencia de una banda secundaria de ~700 pb, cuya intensidad va disminuyendo al aumentar la temperatura hasta desaparecer.

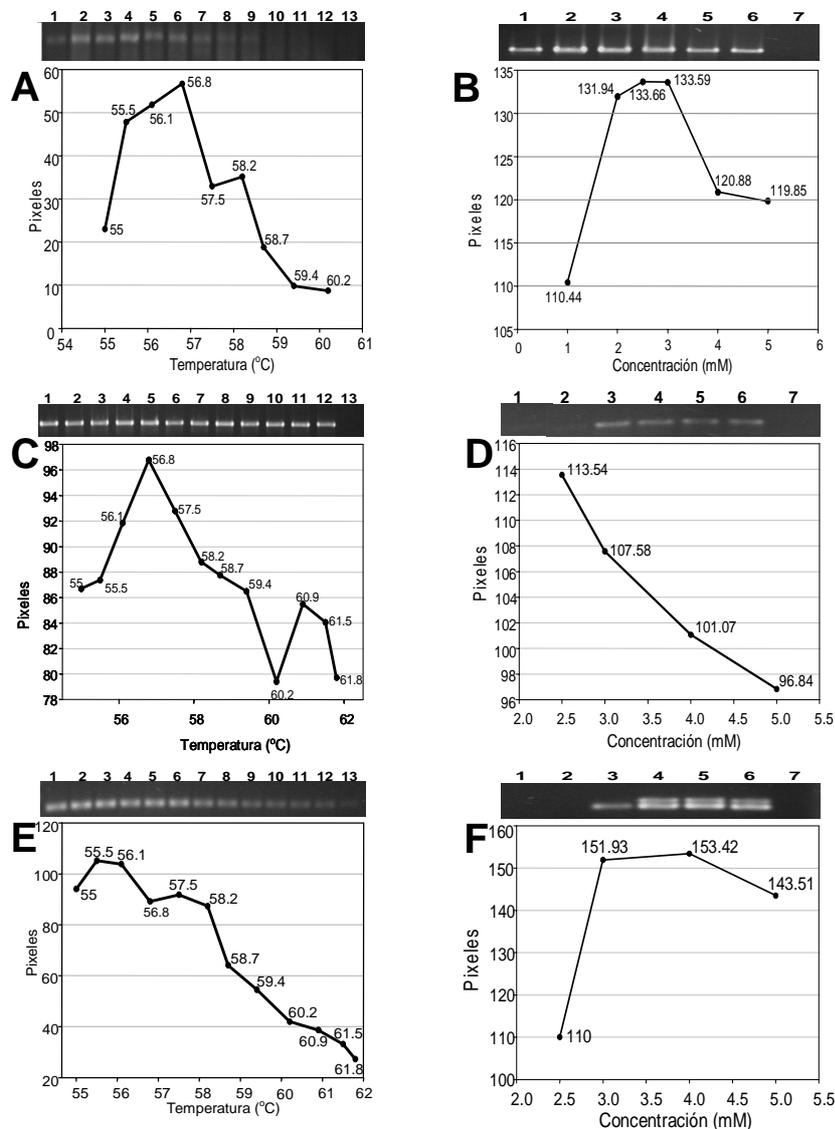


Fig. 4. La amplificación de los productos de ~450, ~650 y ~250 pb depende de la temperatura de alineación y la concentración de cloruro de magnesio. (A, C y E) Electroforesis en agarosa al 1.5% de mezclas de PCR con temperaturas crecientes de alineación (55°C-61.8°C) y 5 ng DNA de la muestra 001. Carriles 1, 55°C; 2, 55.5°C; 3, 56.1°C; 4, 56.8°C; 5, 57.5°C; 6, 58.2°C; 7, 58.7°C; 8, 59.4°C; 9, 60.2°C; 10, 60.9°C; 11, 61.5°C; 12, 61.8°C; 13, 55°C sin DNA (agua); y relación del incremento de la temperatura de alineación en las mezclas de PCR con la fluorescencia (píxeles) de la banda principal medidas con el programa Quantity One (BioRad). **(B, D, F)** Electroforesis en agarosa al 1.5% de mezclas de PCR con concentraciones crecientes de MgCl₂ (1-5 mM) con 25 ng DNA de la muestra 255. Carril 1, 1 mM; 2, 2 mM; 3, 2.5 mM; 4, 3 mM; 5, 4 mM; 6, 5 mM; 7, 5 mM sin DNA (agua); y relación del incremento de la temperatura de alineación en las mezclas de PCR con la fluorescencia (píxeles) de la banda principal.

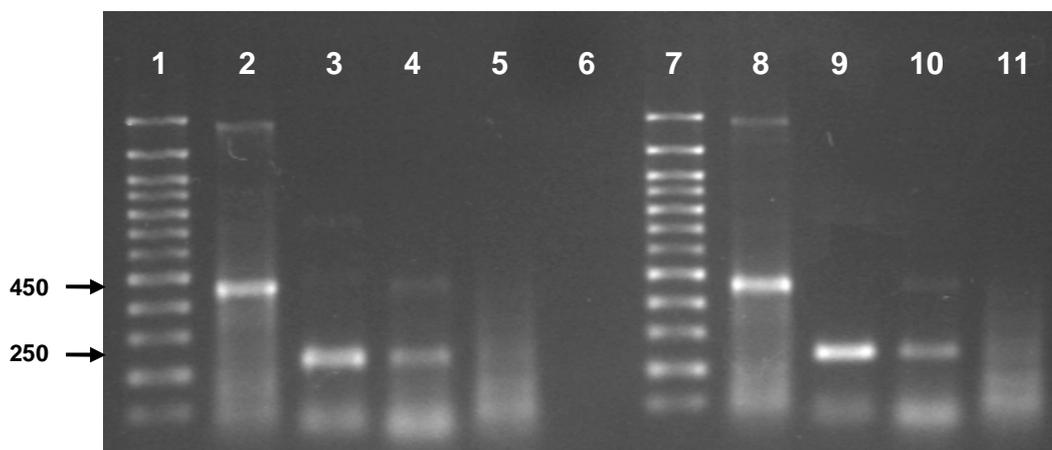


Fig. 5. Las mezclas dúplex con oligonucleótidos MY09/11 y pU 1M/2R inhiben la amplificación de los productos de ~450 pb y ~250 pb. Mezclas de PCR uniplex y dúplex con las parejas de oligonucleótidos MY 09/11 y pU 1M/2R con 50 ng de DNA de la muestra 001. La banda principal amplificada con los oligonucleótidos MY09/11 fue de ~450 pb (carriles 2, 4, 8 y 10) y con los oligonucleótidos pU 1M/2R de ~250 pb (carriles 3, 4, 9 y 10). Carriles 1 y 7, ladder 100 pb. Carriles 2 y 8, mezclas uniplex 1 (pareja MY 09/11). Carriles 3 y 9, mezclas uniplex 2 (pareja pU 1M/2R). Carriles 4 y 10, mezclas dúplex (ambas parejas de oligonucleótidos). Carriles 5 y 11, control negativo (agua).

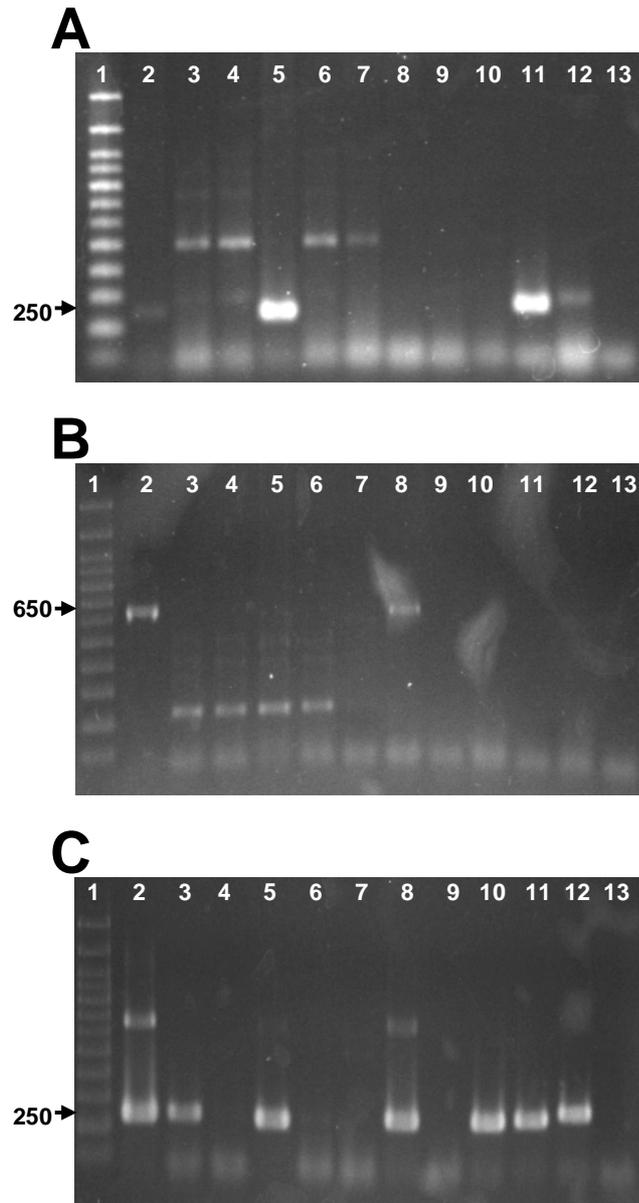


Fig. 6. La PCR anidada es más sensible que la PCR directa para la detección de DNA de HPV-AR. (A) Electroforesis en agarosa al 1.5% de la PCR directa con 25 ng de DNA de distintas muestras que amplifican el producto de E6/E7 ~250 pb. Carril 1, ladder 100 pb. Carriles 2-13 (muestra entre paréntesis): 2 (37), 3 (41), 4 (46), 5 (48), 6 (51), 7 (54), 8 (55), 9 (57), 10 (NB), 11 (59), 12 (HeLa), 13 sin DNA (agua). (B) Amplificación del producto de ~650 pb en mezclas de PCR con 25 ng de DNA de distintas muestras. (C) Amplificación del producto de ~250 pb en mezclas de PCR anidada. Carril 1, ladder 100 pb. Nótese que en algunas muestras se observa como banda secundaria, el producto de ~650 pb que se amplifica en la primera reacción.

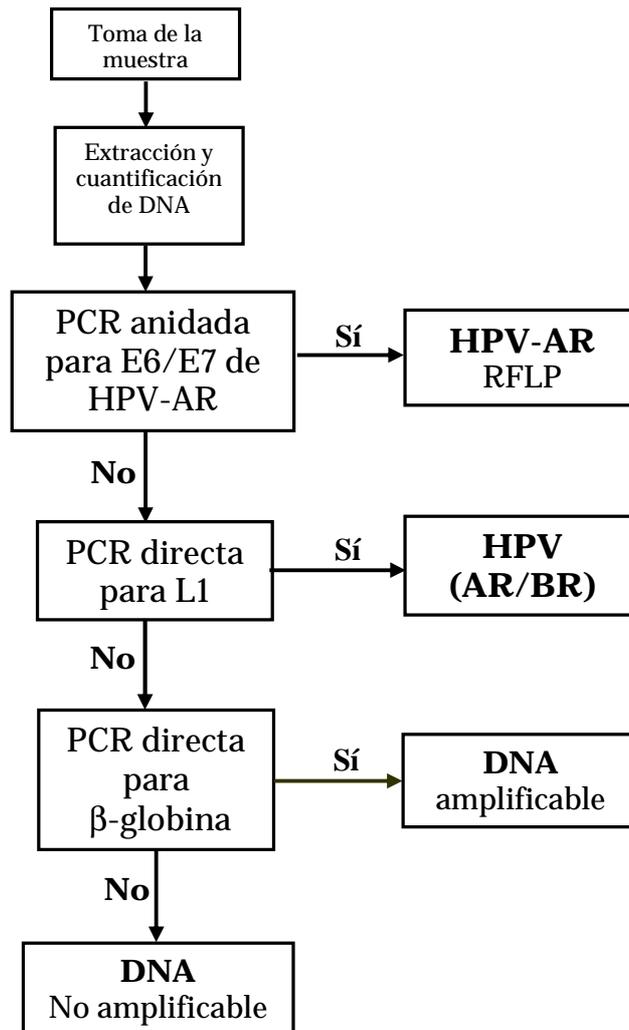


Fig. 7. Diagrama de flujo del método empleado para la detección de DNA de papilomavirus por PCR.

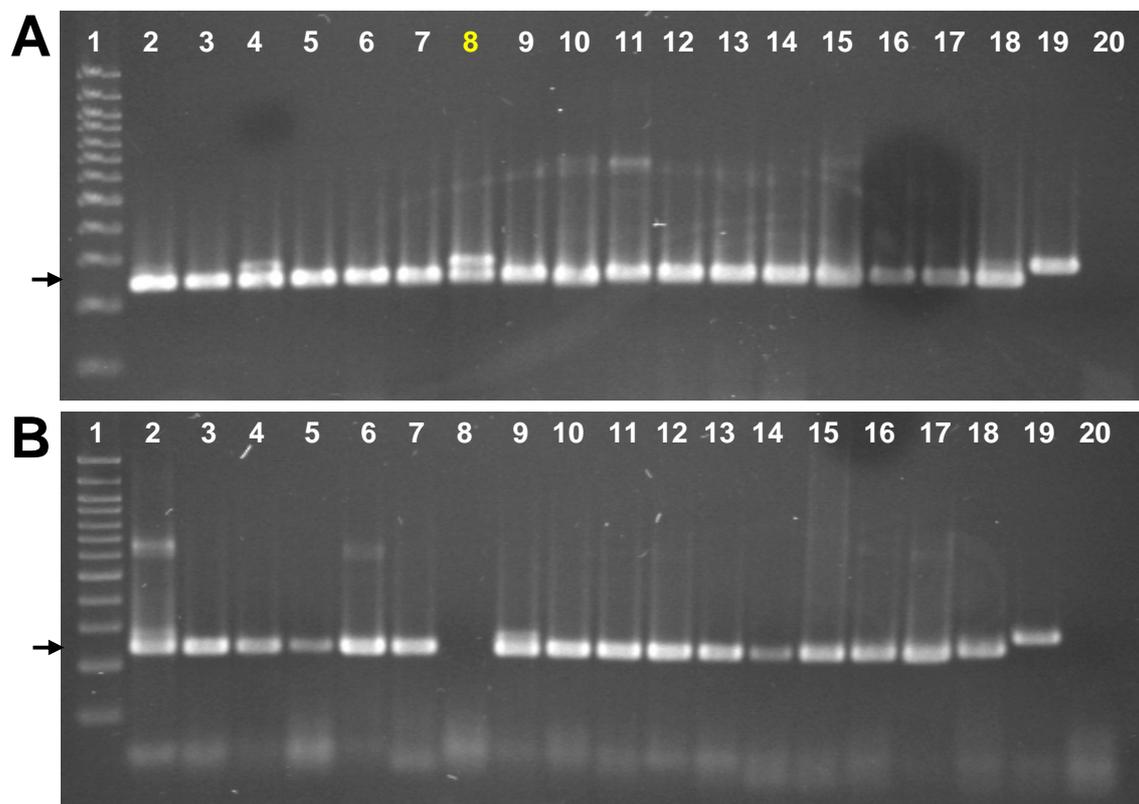


Fig. 8. Ejemplo de la mayor sensibilidad de la PCR anidada para detectar HPV-AR. Amplificación del producto de ~250 pb a partir de 25 ng de DNA de distintas muestras de raspado cervicovaginal en dos experimentos (**A** y **B**). La banda principal está marcada con la flecha de la izquierda. (**A**) Carril 1, ladder 100 pb. Carriles 2-18, DNA de distintas muestras. Carril 19, DNA de HeLa (control positivo). Carril 20, sin DNA (agua). Nótese el doblete en el carril 8. (**B**) Carril 1, ladder 100 pb; carriles 2-18, DNA de distintas muestras; carril 19, DNA HeLa (control positivo); carril 20, sin DNA (agua). Nótese en ambos experimentos (**A** y **B**) que en algunas muestras se observa como banda secundaria, el producto de ~650 pb que se amplifica en la primera reacción.

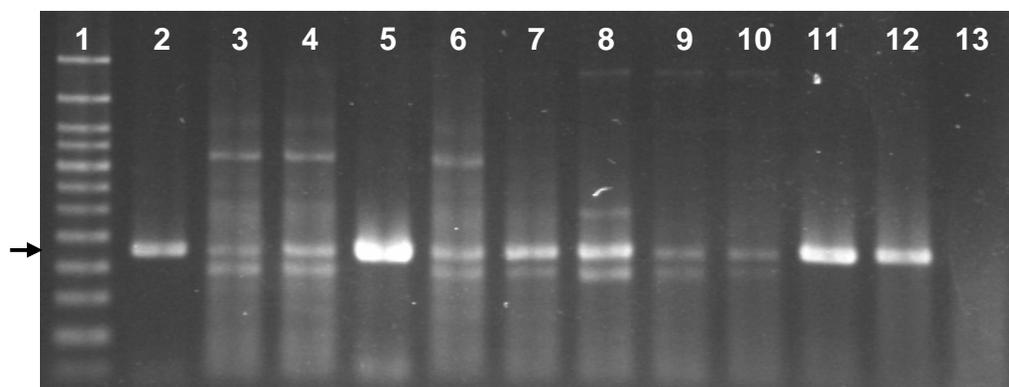


Fig. 9. El producto de la región L1 puede ser amplificado en muestras E6/E7 negativas. Amplificación de un fragmento del gen L1 de papilomavirus con 25 ng de DNA de varias muestras de raspado cervicovaginal. La banda principal amplificada (~450 pb) está marcada con la flecha de la izquierda. Carril 1, ladder 100 pb. Carriles 2 a 13 (muestra): 2 (37), 3 (41), 4 (46), 5 (48), 6 (51), 7 (54), 8 (55), 9 (57), 10 (NB), 11 (59), 12 (HeLa), 13 sin DNA (agua).

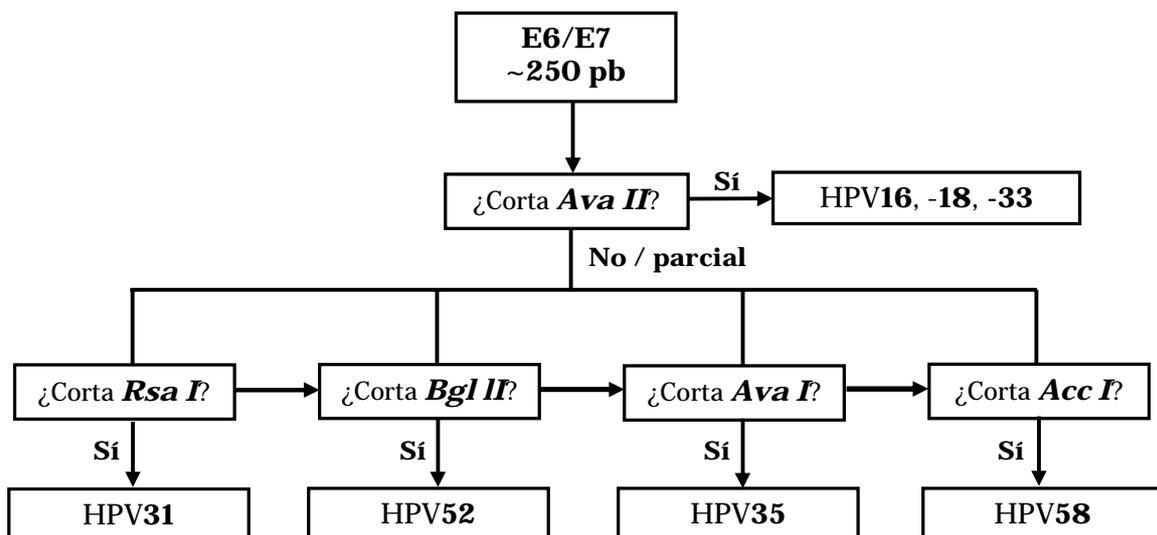


Fig. 10. Diagrama de flujo del método de tipificación de HPV-AR mediante pasos de digestión sucesiva del producto de E6/E7 de ~250 pb con enzimas de restricción.

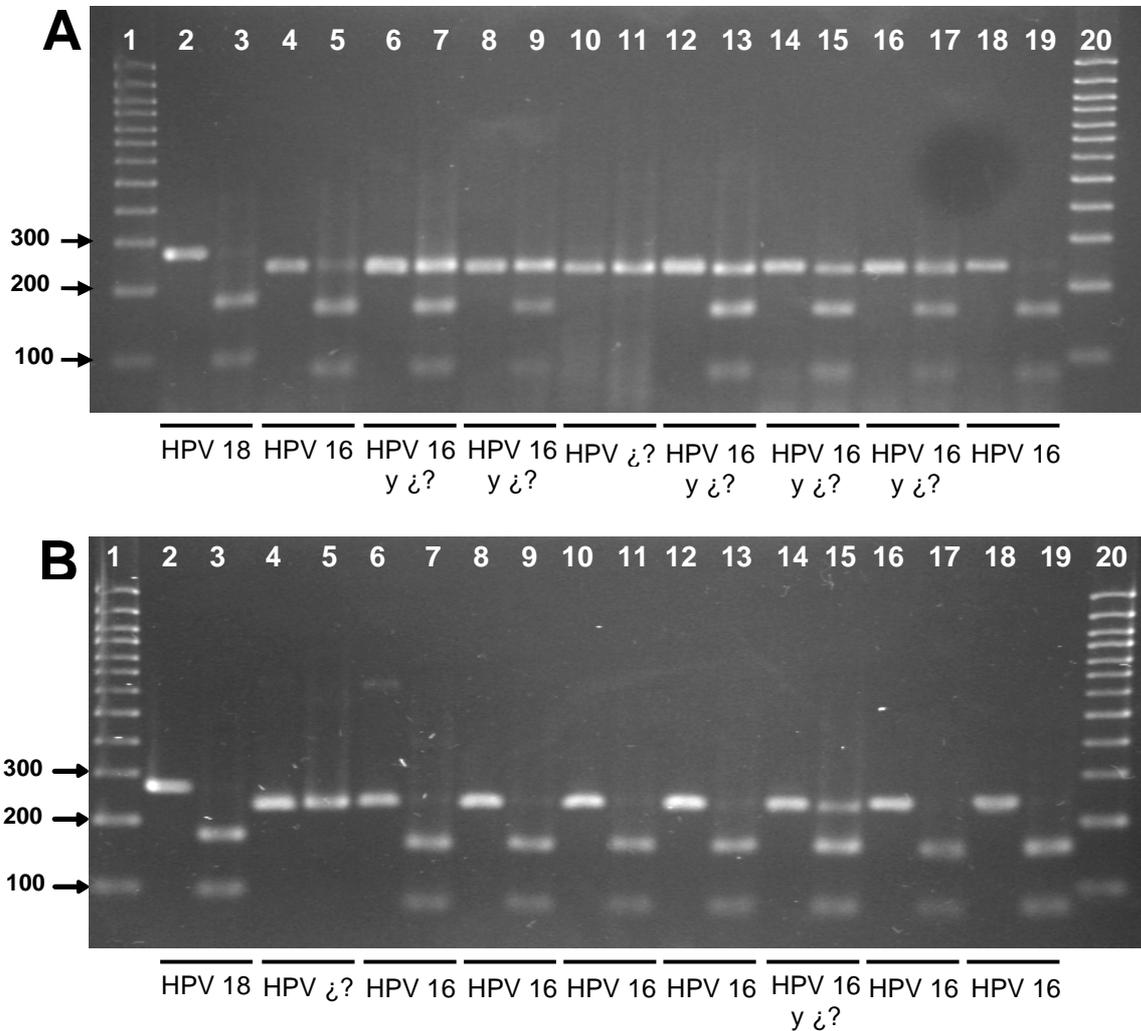


Fig. 11. La digestión del producto E6/E7 de ~250 pb con *Ava II* permite distinguir tres tipos de HPV-AR: 16, 18 y 33. (A) Carriles 1 y 20, ladder de 100 pb. Carriles pares con los productos no digeridos y nones con los productos digeridos de las muestras designadas a continuación: 2 y 3 HeLa; 4 y 5 226, 6 y 7 227, 8 y 9 229, 10 y 11 230, 12 y 13 231, 14 y 15 232, 16 y 17 233, 18 y 19 234. (B) Carriles 1 y 20, ladder de 100 pb. Carriles pares con los productos no digeridos y nones con los productos digeridos de las muestras: 2 y 3 HeLa, 4 y 5 322, 6 y 7 323, 8 y 9 324, 10 y 11 325, 12 y 13 326, 14 y 15 328, 16 y 17 329, 18 y 19 306.

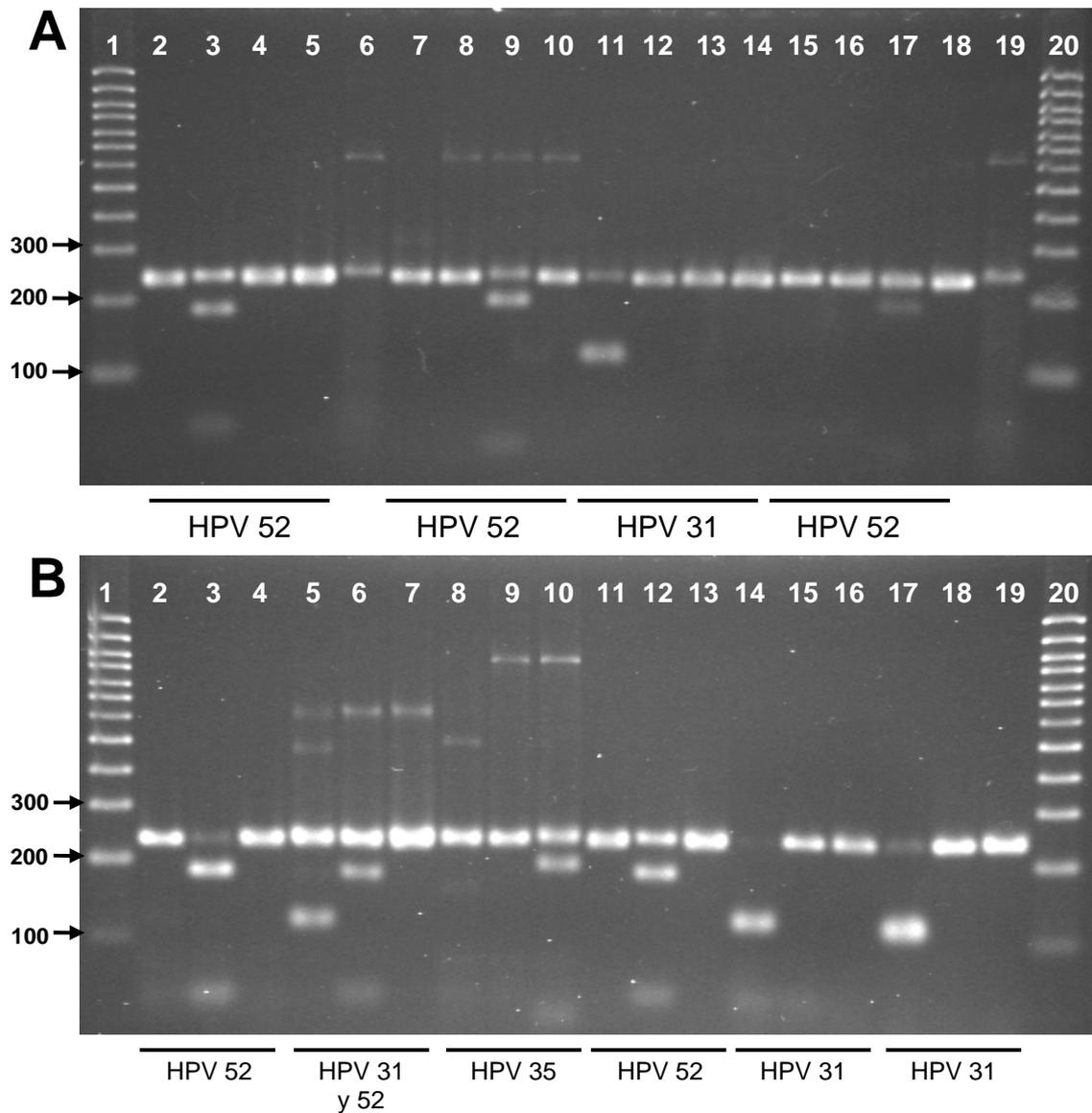


Fig. 12. La incubación del producto E6/E7 ~250 pb con *Rsa* I, *Bgl* II, *Ava* I y *Acc* I permite distinguir los tipos de HPV-AR 31, 52, 35 y 58. (A) En los grupos de cuatro carriles sucesivos se observan los productos de cada muestra amplificada y los fragmentos de restricción obtenidos en las mezclas incubadas respectivamente con las enzimas *Rsa* I, *Bgl* II, *Ava* I y *Acc* I. Carriles 1 y 20, ladder de 100 pb. Carriles 2-5 muestra 282; 7-10 muestra 289; 11-14 muestra 292; 15-18 muestra 297; 6 y 19 muestra 268. **(B)** En los grupos de tres carriles sucesivos se observan los productos de cada muestra amplificada y los fragmentos de restricción obtenidos en las mezclas incubadas respectivamente con las enzimas *Rsa* I, *Bgl* II y *Ava* I. Carriles 1 y 20, ladder de 100 pb. Carriles 2-4 muestra 191; 5-7 muestra 197; 8-10 muestra 203; 11-13 muestra 209; 14-16 muestra 211; 17-19 muestra 246.